

THESIS

MUNICH

1965

LANE MEDICAL LIBRARY
STANFORD UNIVERSITY
300 PASTEUR DRIVE
PALO ALTO, CALIF.

ZUR PHYLOGENIE DES HÄMOGLOBIN- MOLEKÜLS

Untersuchungen am Schwein- und Esel-Hämoglobin

HEINZ KOHLER

Dissertationsdruck Franz Frank, München 23,
Werneckstraße 27, Tel. 34 36 51

Aus dem Max-Planck-Institut für Biochemie, München
Direktor: Professor Dr. A. Butenandt

Zur Phylogenie des Hämoglobin-
Moleküls:

Untersuchungen am Schwein- und Esel-Hämoglobin

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde in der gesamten Medizin
verfaßt und einer Hohen Medizinischen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von

Heinz Köhler

aus

Duisburg

1965

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. Dr. A. Butenandt

Dekan : Prof. Dr. O. Hug

Tag der mündlichen Prüfung: 30.7.65

Die vorliegende Arbeit wurde unter Leitung von Professor Dr. A. Butenandt am Max-Planck-Institut für Biochemie in München in der Zeit von Oktober 1961 bis Juli 1963 ausgeführt.

Herrn Professor Dr. Adolf Butenandt danke ich sehr herzlich für die großzügige Förderung und Unterstützung meiner Arbeit und Herrn Dozent Dr. G. Braunitzer für die vielen Anregungen und hilfsbereite Anleitung zu meiner Arbeit.

Für die Durchführung der Aminosäure-Analysen danke ich Frau K. Steinhoff.



Digitized by the Internet Archive
in 2026

Inhaltsverzeichnis

	Seite
Abkürzungsverzeichnis	
Einleitung	1

Allgemeiner Teil

I. Das Hämoglobin des Schweines, des Esels und des Zebras	
a) Homogenität der Hämoglobine	5
b) Globingewinnung	7
c) Kettentrennung und Analysen	8
II. Die löslichen tryptischen Spaltprodukte	
a) Tryptische Spaltung und "Core"-Ausfällung	12
b) Chromatographie über Dowex 1x2	14
c) Rechromatographien	16
d) Quantitative Vermessung der Spaltprodukte	21
III. Partialformel der tryptischen Peptide des Schwein-Hämoglobins	
α -Kette	22
β -Kette	26
IV. Die unlöslichen tryptischen Peptide	
a) Oxydation mit Perameisensäure	31
b) SH-Blockierung mit Jodacetamid	32
c) Tryptische Nachspaltung	32
d) Säulenchromatographie bei hoher Ionenstärke	34
e) Spaltungen des "Core"	
α -"Core"	35
β -"Core"	38

Experimenteller Teil

I. Die tryptischen Peptide der α -Kette des Schwein-Hämoglobins	43
II. Die tryptischen Peptide der β -Kette des Schwein-Hämoglobins	47
III. Chymotryptische Peptide des α -"Core" des Schwein-Hämoglobins	52
IV. Peptische Peptide des β -"Core" des Schwein-Hämoglobins	54

V. Einige lösliche tryptische Peptide des Esel-Hämoglobins	56
VI. Die Methoden	
1. Reinigungs- und Isolierungsmethoden	
a) Blutgewinnung	60
b) Hämoglobingewinnung	60
c) Analytische Trennung der Hämoglobin-komponenten	60
d) Trennung der Polypeptidketten	61
e) Reduktion des Globins	62
f) Säulenchromatographie mit Dowex 1x2	62
g) Rechromatographien	64
h) Sprühreaktionen	65
i) Aufarbeitung der Fraktionen	60
2. Spaltungs- und Sequenzierungsmethoden	
a) Denaturierung des Materials	66
b) Tryptische Spaltung	66
c) Chymotryptische Spaltung	67
d) Peptische Spaltung	67
e) Quantitative Aminosäurenanalyse	67
f) Oxydation mit Perameisensäure	67
g) Carboxypeptidase-Spaltung	68
h) Edman-Abbau	68

Diskussion der Ergebnisse

I. Vergleichende Betrachtung der Primärstrukturen von Human-, Schwein-, Lama-, Esel-, Kaninchen- und Pferde-Hämoglobin	70
II. Vergleichende Betrachtung von verschiedenen Tier-Hämoglobinen unter Einbeziehung der Tertiärstruktur	72
Literaturverzeichnis	77
Zusammenfassung	78
Lebenslauf	79

Abkürzungsverzeichnis

Die Aminosäuren werden nach dem Vorschlag von BRAND und EDSALL abgekürzt.

Sonstige verwendete Abkürzungen sind:

Pyr	= Pyridin
Coll	= Collidin
α -Pic	= α -Picolin
2,4-Lut.	= 2,4-Lutidin
Ac	= Acetat
HAc	= Essigsäure
DCA	= Dichloressigsäure
Tp	= Tryptisches Peptid des Human-Hämoglobins
ST	= Tryptisches Peptid des Schwein-Hämoglobins
ET	= Tryptisches Peptid des Esel-Hämoglobins
SCh	= Chymotrypt. Peptid des Schwein-Hämoglobins
SP	= Peptisches Peptid des Schwein-Hämoglobins

Einleitung

Medizin und Naturwissenschaft stehen in ihrer humanen Relevanz gleichwertig nebeneinander: die Medizin von einer humanitären und sanitären Intention geleitet, die Naturwissenschaft dem erkenntnistheoretischen Ideal folgend. Die neueren Entwicklungen in beiden Disziplinen zeigen, daß eine Annäherung in der Intention und ein Synergismus in der Methode möglich, ja notwendig sind.

In dem Bemühen des patho-physiologisch denkenden Mediziners, das Wesen einer Krankheit zu ergründen, dessen Kenntnis Voraussetzung für eine kausale Therapie ist, liegt bereits der Keim zu wissenschaftlich befriedigender Erkenntnis.

Bei der zunächst nur phänomenologisch-deskriptiven Erkenntnisarbeit der älteren Pathologen gelangen durch Verwendung naturwissenschaftlicher Methoden immer tiefere Einblicke in das Krankheitsgeschehen. Später wurde in neue Forschungsgebiete vorgedrungen, die als Grenzgebiete zwischen Naturwissenschaft und Medizin zu betrachten sind. Die neuen Methoden, wie sie von der Biochemie, Biophysik und Kybernetik entwickelt wurden, führten den Vorstoß der medizinisch-morphologischen Forschung bis an die Grenze des molekularen Bereiches, wie es Bilder aus der Elektronenmikroskopie und Ergebnisse aus der Stoffwechsel-Forschung zeigen. Wird gar der molekulare Bereich betreten, was durch biochemische und Röntgeninterferenz-Methoden geschehen ist, so gelangt man gewissermaßen zu einer letzten, endgültigen Morphologie, die durch weitere Analyse in ihrer ätiologischen Einheit zerstört würde und aus dem Bereich des Biologischen ins Organisch-Chemische herausfielen.

In dieser molekularen Morphologie haben wir nicht nur den Endpunkt einer deskriptiven Forschungsabsicht zu sehen, sondern gleichzeitig auch die Bausteine für das ätiologisch-

essentielle Substrat des Lebens in Händen. So kann die medizinische Forschung auf molekularer Ebene der erkenntnistheoretischen Forderung der Naturwissenschaft genügen.

Die Fortschritte in Physik und Chemie schufen die Voraussetzung zur Beschäftigung der Naturwissenschaft mit dem Phänomen des gesunden und des erkrankten Lebens. Der Begriff des Krankhaften, des Abnormalen, des Pathologischen tritt hiermit in der exakt-naturwissenschaftlichen Terminologie zum ersten Male auf. Mit dieser Erweiterung der naturwissenschaftlichen Forschungsthematik beginnt die Naturwissenschaft in Form von Biologie und Biochemie die Verantwortung für menschliche Gesundheit und Krankheit mit der Medizin zu teilen.

Von der naturwissenschaftlichen Seite kam der erste Anstoß zu diesem neuen Denken in Medizin und Naturwissenschaft, der zur Prägung der Begriffe Molekularmedizin und Molekularbiologie führte. Pauling (1) konnte als erster am Beispiel des Sichelzell-Hämoglobins diese Begriffe prägen. Die molekulare Pathologie dieses und weiterer abnormaler Hämoglobine beruht auf dem Austausch eines einzigen Bausteines im Hämoglobin-Molekül gegen einen anderen. Mit der Kenntnis der molekularen Ätiologie am Beispiel der Sichelzell-Anämie ist jedoch noch nicht die Kausalkette zwischen dem klinischen Krankheitsbild und der zugrunde liegenden molekularen Abnormalität geschlossen. Die Frage richtet sich auf das wesentliche Phänomen der Sichelung in sauerstoffarmem Milieu. Die Ursache dieses Vorganges sind veränderte physikalisch-chemische Eigenschaften des Hämoglobinmoleküls, für die der Austausch eines Aminosäurerestes verantwortlich ist. Die Tertiär- und Quaternärstruktur des Moleküls soll sich bei niedrigem Sauerstoff-Partialdruck so verändern, daß durch Löslichkeitsminderung eine Gelbildung des Hämoglobins im Erythrozyten eintritt. Dieser Vorgang imponiert dann im Mikroskop als Sichel-Phänomen.

Die Bedeutung einer definierten räumlichen Struktur des Hämoglobinmoleküls für die normale Funktion wird außer durch

diesen Befund auch durch die röntgenstruktur-analytischen Arbeiten von Kendrew und Perutz unterstrichen. Für das Wal-Methämoglobin und das Pferde-Oxyhämoglobin konnten räumliche Modelle konstruiert werden (2). Die Mitwirkung des allosterischen Effektes bei der Funktion des Hämoglobinmoleküls, welche Perutz als Konformationsänderung beim Übergang des O_2 -freien zu O_2 -beladenem Molekül aufzeigen konnte, verdeutlichen ebenfalls die Funktions-bedingte und -bedingende Bedeutung der räumlichen Struktur des Hämoglobinmoleküls.

Vergleichende Untersuchungen an verschiedenen Säugetier-Hämoglobinen mit physikalischen und chemischen Methoden lassen als gesichert erscheinen, daß die Quaternärstruktur der einzelnen Hämoglobine im wesentlichen identisch ist (3). Diese bestimmte räumliche Struktur des Moleküls scheint damit der wichtigste Faktor und die Voraussetzung für die den Hämoglobinen eigene Funktion zu sein. Wesentlich größer als die Unterschiede in der Konformation des Moleküls sind die in der Primärstruktur, d.h. in der Aminosäurenzusammensetzung. Da es heute als erwiesen gilt, daß die Primärstruktur den determinierenden Faktor für den räumlichen Aufbau eines Eiweißmoleküls darstellt, drängt sich folgende Frage auf: Wie ermöglichen verschiedene Primärstrukturen verschiedener Hämoglobine diesen charakteristischen, identischen räumlichen Bau des Moleküls? Durch die Konstanz der räumlichen Struktur bei unterschiedlicher Primärstruktur ließe sich die Frage noch allgemeiner stellen nach dem Verhältnis von Primärstruktur zu Tertiärstruktur und Quaternärstruktur. Der Vergleich möglichst vieler Primärstrukturen verschiedener Säuger-Hämoglobine könnte unter dieser Voraussetzung Aufschluß über α -Helix-bildende und nicht bildende Sequenzen geben, über eine mögliche Beeinflussung räumlich benachbarter Strukturen und über den Einfluß solcher Strukturen auf die Ausbildung einer α -Helix.

Neben dieser Bedeutung für das Problem Primärstruktur zu Quaternär- und Tertiärstruktur können vergleichende Unter-

suchungen an Tierhämoglobinen einen Beitrag zur Phylogenese des Hämoglobinmoleküls liefern. Das Ausmaß der Ähnlichkeit der Primärstrukturen läßt Aussagen über den phylogenetischen Abstand ihrer Träger zu, so daß man mit diesem neuen Kriterium die Evolutionsreihen von Tierstämmen überprüfen und bestätigen könnte. Die schon vorliegenden Ergebnisse zeigen interessante Einblicke in die Phylogenese des Hämoglobinmoleküls, das sich aus einem einsträngigen Stadium des Myoglobins und des Lampetra-Hämoglobins mit der Abzweigung einer Nebenlinie hochpolymerer Stufen bei Insekten bis zum tetrameren Modell der Säuger entwickelt hat.

Die Wichtigkeit der Kenntnis proteinchemischer Methodik wird durch die häufige medizinische Problemstellung aufgezeigt, welche sich aus der umfangreichen Pathologie der Eiweißstoffe und -strukturen ergibt. Eiweißmoleküle sind die Bauelemente und funktionstragenden Stoffe des Lebens.

Zwei große Gruppen von Krankheiten sind es, deren pathologisch-anatomisches Substrat sich in Veränderungen von Proteinen manifestiert. Einmal die große Anzahl der kongenitalen Fermentstörungen und dann die Erkrankungen, welche im ätiologischen Zusammenhang mit der Bildung und Veränderung der Serumproteine stehen, also die Störungen der Antikörperbildung. Erst die Kenntnis des Aufbaues der Serumeiweiße, der Fermente und deren Funktionsweise wird die Möglichkeit schaffen, eine kausale Therapie für diese Krankheiten zu finden.

Allgemeiner Teil

I. Das Hämoglobin des Schweines, des Esels und des Zebras

Die Aufklärung der Primärstruktur des Humanhämoglobins (4) und die Teilaufklärung weiterer Tierhämoglobine haben gezeigt, daß Hämoglobine definierte Makromoleküle sind. Die Molekulargewichte der Hämoglobine der Säugetiergruppe liegen bei 66000 (5). Das Hämoglobinmolekül enthält vier Hämgruppen, welche aus vier Porphyrinringen und vier Eisen-Atomen zusammengesetzt sind. Jede dieser Hämgruppen ist mit einer Polypeptidkette verbunden, von denen je zwei identisch sind. Die Aminosäurenanzahl der einen Polypeptidkette, der sog. α -Kette, beträgt 141, die der sog. β -Kette 146. Die Angabe der Positionen der einzelnen Aminosäurereste erfolgt durch Zählung der Reste vom N-terminalen Ende der Kette her. Die Spezies-Spezifität einzelner Tierhämoglobine der Säugetiergruppe liegt in der unterschiedlichen Aminosäuresequenz der Peptidketten.

Die röntgenstrukturanalytischen Arbeiten am Myoglobin von Kendrew und am Pferdehämoglobin und Humanhämoglobin von Perutz haben ein gemeinsames räumliches Bauprinzip des Moleküls erkennen lassen. Die Tertiärstruktur der α - und β -Ketten ist durch die Ausbildung von acht helikalen Bereichen bestimmt, die durch Abschnitte nicht-helikaler Art unterbrochen sind.

a) Homogenität der Hämoglobinlösung

Wie im Lysat des menschlichen Blutes finden sich auch bei vielen Säugetieren Haupt- und Nebenkomponten des Hämoglobins. Elektrophoretische und säulenchromatographische Untersuchungen können Aufschluß über das Vorhandensein und das ungefähre Mengenverhältnis einzelner Hämoglobinkomponten geben. So zeigen die Lysate von Schwein- und Eselblut nur eine Hauptkomponente. Dieser Umstand erlaubt es, die Hämoglobinlösungen dieser Tiere ohne Vortrennung der Untersuchung zuzuführen.

1. Schwein-Hämoglobin

Das Vorhandensein nur einer Hauptkomponente im Hämoglobins-
lysat von Schweineblut konnte mittels Stärkegel-Elektropho-
rese gezeigt werden. Sie wurde in verschiedenen pH-Berei-
chen durchgeführt.

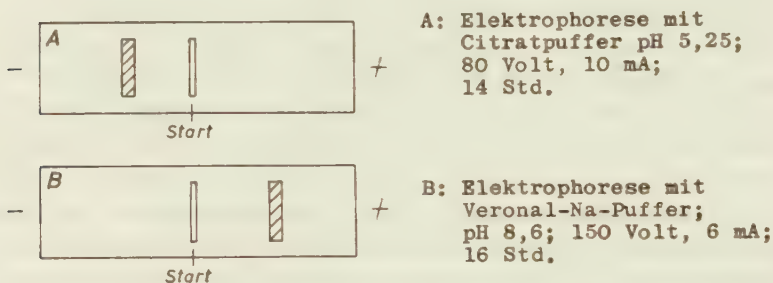


Abb. 1: Stärkegel-Elektrophorese mit Schwein-
Hämoglobin

2. Esel-, Maulesel- und Zebra-Hämoglobin

Die Hämoglobinkomponenten im Blut von Esel, Maulesel und Zebra wurden mit säulenchromatographischen Methoden unter-
sucht. Die Chromatographie erfolgte im Na-Phosphat-Zyklus
über Carboxymethyl-Cellulose nach vorausgegangener Oxyda-
tion des Hämoglobins zu Methämoglobin mit roten Blutlaugen-
salz. Dabei zeigte das Eselhämoglobin nur eine sog. lang-
same Komponente, die der langsamen Komponente des Pferde-
hämoglobins chromatographisch entspricht. Beim Maulesel
findet man mit dieser Methode eine schnelle und eine lang-
same Fraktion annähernd in einem Verhältnis 1:3. Beim Zebra
ließen sich zwei schnelle und eine langsame Komponente er-
kennen.

Am ungetrennten Globinmaterial des Schweinhämoglobins wurde
außerdem eine Endgruppenbestimmung nach der Cyanatmethode
durchgeführt (6). Als N-ständige Aminosäure für beide Ketten
konnte Valin vermessen werden.

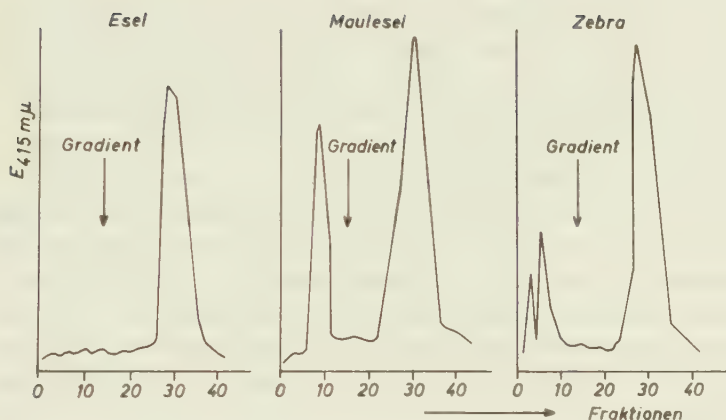


Abb. 2: Säulenchromatographische Auftrennung von Esel-, Maulesel- und Zebra-Hämoglobin über Carboxymethyl-Cellulose

Säulenmaße: 30x2,0 cm. Fraktionsgröße: 2 ml

Äquilibriumierung: 0,01n Na-Phosphat pH 7,2;

Gradient: 0,4n Na-Phosphat pH 7,2;

Extinktionsmessung bei 415 m μ

Diese Untersuchungen über Hämoglobine einiger Säugetiere zeigten, daß Schwein und Esel je eine Hauptkomponente besitzen, während sich bei Maulesel und Zebra mehrere Hämoglobine finden. Damit konnten ältere Befunde bestätigt werden (7).

b) Globingewinnung

Die Gerinnung des frisch vom Tier entnommenen Blutes wurde teils durch Citratzusatz teils durch Heparinisierung verhindert. Das Heparin-stabilisierte Blut zeigte bei der weiteren Verarbeitung den Vorteil einer geringeren Ionenstärke und einer höheren Hämoglobinkonzentration gegenüber dem

Citratblut. Die Erythrozyten wurden mehrmals mit physiologischer Kochsalzlösung gewaschen und niedertourig zentrifugiert. Die Lysierung erfolgte durch Verringerung des osmotischen Druckes. Durch zweimaliges hohtouriges Abzentrifugieren der Zellmembranbestandteile erhält man eine Hämoglobinlösung, deren Konzentration durch Messung der Adsorption bei 415 m μ bestimmt werden kann. Die Häm-Gruppe wird bei -15 bis -20 Grad in 10% HCl-Aceton-Lösung unter tropfenweiser Zugabe der Hämoglobinlösung und ständigem Rühren abgespalten. Das Globin wird anschließend mit derselben HCl-Aceton-Lösung mehrmals gewaschen und zentrifugiert. Da die Hämabspaltung nicht quantitativ erfolgt, sind drei bis vier Operationen notwendig. Die Globin-Lösung wird darauf gegen 1% Essigsäure dialysiert und lyophilisiert.

c) Kettentrennung und Analysen

Die Gewinnung von α - und β -Kettenmaterial wurde nach der von Craig angegebenen Methode (8) im System sek. Butanol/DCA durchgeführt. Die bei Human-Hämoglobin optimale Dichloressigsäure-Konzentration von 1% konnte für das Schwein-Hämoglobin übernommen werden. Die Gegenstromverteilung auf einer 2x25 ml-Maschine ergab nach 110 Schritten eine gute Trennung des Globins.

Da die Kapazität dieses Systems durch die Verschlechterung der Trennung auf 1,5 g beschränkt ist, schien die Modifikation der Methode nach Hill und Mitarbeitern (9) vorteilhafter, weil sie Konzentrationen bis 25 mg/ml erlaubt. Hierbei wird die Ionenstärke der wässrigen Phase durch Zusatz von Essigsäure erhöht. So konnten in einem Versuch 5 g Globin erfolgreich in Kettenmaterial aufgetrennt werden. Ein weiterer Vorteil dieser Modifikation sind kürzere Absatz-Zeiten, welche Ausbeute und Reinheit der Ketten steigern. Zur Verbesserung der Trennung trug ferner eine 12 bis 14-stündige Vortrennung des Materials im äquilibrierten Raum bei. Eine wechselnd bei

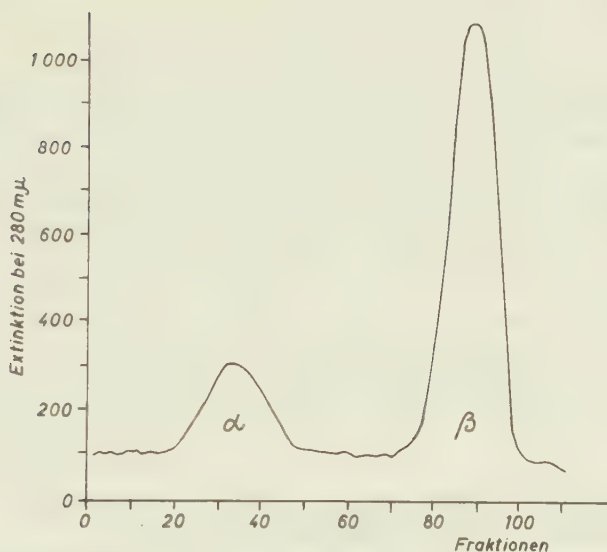


Abb. 3: Gegenstromverteilungsdiagramm von 1,5 g Schwein-Globin über 110-Verteilungsschritte

Unterphase: 25 ml 1% DCA

Oberphase: 25 ml sek. Butanol

Temperatur: 20°C

Ausgezogene Kurve: UV-Adsorption der vereinigten Ober- u. Unterphase bei 280 mμ

den einzelnen Versuchen auftretende Zwischenphase konnte nach kurzer Zentrifugation getrennt und den Phasen wieder zugegeben werden.

Um eine weitere Erhöhung der Ausbeute und Reinheit der Ketten-trennung zu erreichen, wurde der Gegenstromverteilung eine Reduktion der SH-Gruppen mit Merkapto-Äthanol in 10n Harnstoff vorangestellt (10). Die reduzierten SH-Gruppen des Globins sind im saueren Milieu bei pH 4 beständig, so daß eine Dialyse gegen die saure Phase des Systems angeschlossen werden kann. Die Reduktion des Globins brachte jedoch

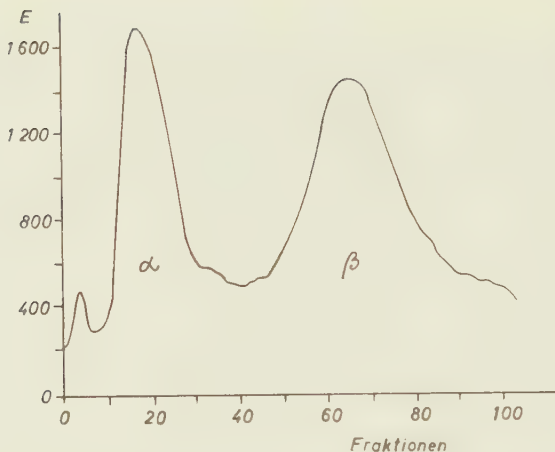


Abb. 4: Gegenstromverteilungsdiagramm von 5 g Schwein-Globin über 100 Verteilungsschritte

Unterphase: 1 Teil 10% DCA + 9 Teile 0,5n Essigsäure (25 ml)

Oberphase: 9 Teile sek. Butanol (25 ml)

Ausgezogene Kurve: UV-Adsorption der vereinigten Ober- u. Unterphase bei 280 mμ

keine Verbesserung der Ausbeute und Trennung in der Verteilung.

Um einen ersten Aufschluß von der quantitativen Zusammensetzung der beiden getrennten Ketten zu erhalten, sind diese mit 6n-HCl zu hydrolysieren und die Molanteile auf dem automatischen Aminosäuren-Analysator zu bestimmen. Da bei einer 20-stündigen Hydrolysenzeit nicht alle Peptidbindungen restlos aufgehen, verlängert man die Hydrolysendauer in einem weiteren Ansatz. Durch die längere Salzsäure-Einwirkung werden jedoch bestimmte Aminosäuren teilweise oder ganz zerstört (Tryptophan, Cystein, Serin, Threonin, Methionin, Tyrosin), so daß man nur durch einen Vergleich der Werte aus der 20-stündigen und der 70-stündigen Hydrolyse unter Einbeziehung bestimmter Verlustfaktoren in der Berechnung der Molanteile zu relevanten Mittelwerten gelangen kann. Die Amino-

säure Tryptophan kann mit dieser Methode nicht erfaßt werden, da sie durch saure Hydrolyse vollständig zerstört wird. Für den Nachweis von Tryptophan wurden nur Sprühteste oder Extinktionsmessungen im UV herangezogen. Cystein wird nach Oxydation mit Perameisensäure als Cysteinsäure vermessen. Diese Oxydation erfolgt in einem getrennten Ansatz schonend in Gefrierpunktsnähe (11). Die Auswertung der Analysen erfolgt durch Umrechnung auf das kleinste vorhandene Vielfache, das in beiden Ketten Cystein ist.

Der Vergleich dieser Ergebnisse mit der Summe der Aminosäuren, die sich durch Addition der Aminosäuren aus den einzelnen vermessenen tryptischen Peptiden errechnen ließ, war als Kontrollmöglichkeit sehr wertvoll und zeigte befriedigende Übereinstimmung.

Tabelle 1: Molanteile der Aminosäuren der α - u. β -Kette des Schwein-Globins nach 20- u. 70-stündiger Hydrolyse

α-Kette					β-Kette			
	Human- Hämo- globin	Schwein- Hämo- globin	20- std.	70- std.	Human- Hämo- globin	Schwein- Hämo- globin	20- std.	70- std.
Lys	11		10,3	10,6	11		10,5	11,4
His	10		7,3	7,6	9		7,5	8,1
Arg	3		4,3	4,1	3		4,7	4,7
Asp	12		16,2	16,4	13		16,7	17,1
Thr	9		3,7	2,0	7		2,4	1,9
Ser	11		5,7	4,1	5		5,8	4,2
Glu	5		12,0	12,1	11		12,9	12,6
Pro	7		4,1	4,5	7		4,5	4,8
Gly	7		13,0	12,6	13		13,3	12,6
Ala	21		14,2	14,1	15		15,2	14,0
Val	13		18,1	18,7	18		17,6	15,7
I-Leu	-		1,0	1,2	-		0,8	1,2
Leu	18		18,6	18,4	18		17,5	19,5
Tyr	3		1,8	-	3		2,0	-
Phe	7		7,0	7,9	8		7,9	8,2
Cys	1		-	-	2		-	-
Met					1		-	-

II. Die löslichen tryptischen Spaltprodukte

a) Tryptische Spaltung und "Core"-Ausfällung

Die Strukturaufklärung an Polypeptidketten von Eiweißkörpern ist durch zwei methodische Prinzipien gekennzeichnet: erstens Spaltung der Kette in definierte Bruchstücke, deren Aminosäuren-Sequenz durch weitere Spaltungs- und Abbau-Schritte ermittelt wird. In einem zweiten Schritt wird die Reihenfolge der nunmehr bekannten Spaltprodukte festgelegt. Zur Durchführung des ersten Schrittes, der Spaltung der Peptidketten, wurde das Ferment Trypsin herangezogen, das zu löslichen, sowie zu isoelektrisch fällbaren Spaltprodukten führt.

Die Eigenschaften des Trypsins haben sich bei den Arbeiten über die Primärstruktur des Human-Hämoglobins bewährt. Die Spezifität des Fermentes liefert definierte Spaltstücke, deren C-Terminus Lysin oder Arginin ist. Die bei Human-Hämoglobin erarbeiteten Bedingungen für die tryptische Spaltung (12) konnten auch an den Tierhämoglobinen angewandt werden. Aus den tryptischen Hydrolysaten beider Ketten konnten jeweils zwei sog. ditryptische Peptide, d.h. Peptide mit zwei Trypsin-sensitiven Aminosäurenresten, isoliert werden. Dieser Befund zeigt deutlich eine gewisse Variabilität der enzymatischen Spezifität des Trypsins. Die Ausbeute der einzelnen Peptide war sehr unterschiedlich, was die Vermessung und Zuordnung oft erschwerte.

Wie bei Human-Hämoglobin konnten Peptide isoelektrisch bei pH 6,4 ausgefällt werden. Das Trockengewicht des gefällten Anteils betrug ein Drittel des zur Spaltung angesetzten Materials. Die Entstehung dieses sog. "Core" ist nicht an den Gehalt von Cystein gebunden, sondern schon eine Häufung von neutralen Aminosäuren mit sperrigen hydrophoben Seitenketten in der Peptidsequenz vermag zu schwerlöslichen "Core"-Spaltstücken führen. So konnte das einzige Cystein-haltige Peptid der β -Kette aus dem löslichen Überstand isoliert werden, während das eigentliche β -"Core" kein Cystein enthielt.

Zur tryptischen Spaltung gelangten sowohl Gesamtglobin als auch die getrennten Ketten. Dabei zeigte jedoch die anschließende säulenchromatographische Auftrennung, daß das Gemisch der tryptischen Peptide aus Gesamtglobin zu komplex ist um alle Spaltprodukte mit Sicherheit isolieren zu können. Erst die Säulenchromatographie des Peptidgemisches aus Kettenmaterial ließ alle Spaltstücke auffinden. Die folgenden Abbildungen 5 und 6 zeigen die Übersichtschromatogramme der über Dowex 1x2 säulenchromatographisch getrennten tryptischen Peptide von getrennter β -Kette bzw. Gesamtglobin.

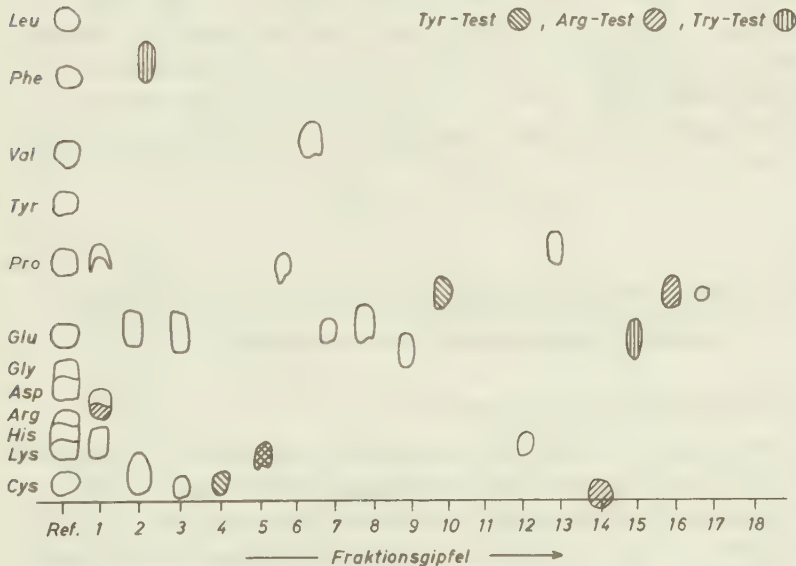


Abb. 5: Übersichtschromatogramm der fraktionierten Peptide aus der β -Kette des Schwein-Hämoglobins im absteigenden Patridge-System

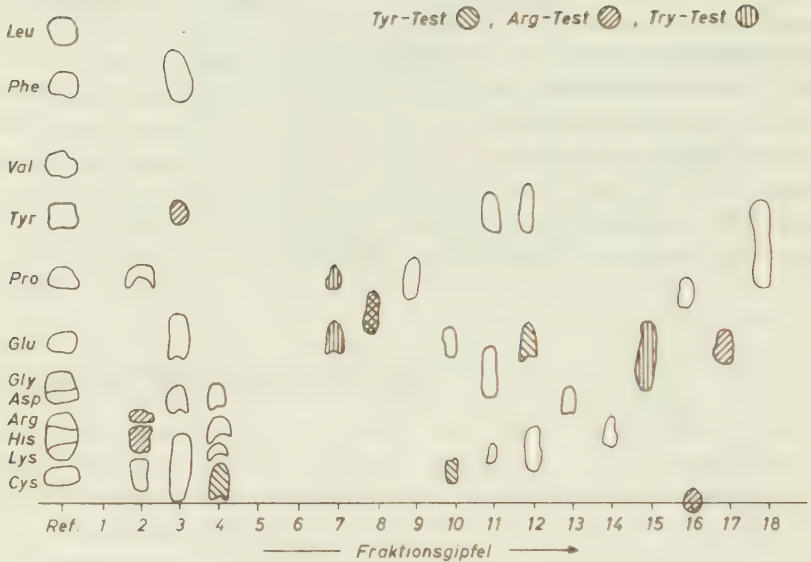


Abb. 6: Übersichtschromatogramm der fraktionierten Peptide aus ungetrenntem Globinmaterial des Schwein-Hämoglobins im absteigenden Patridge-System

b) Chromatographie über Dowex 1x2

Die Anwendung des Dowex 1x2-Verfahren nach Rudloff und Braunitzer (13) zur Auftrennung tryptischer Peptidgemische von Tierhämoglobinen ergab gute Trennungen. Bekanntlich sind Trennungen und Ausbeute einzelner Peptide mit diesem Verfahren unterschiedlich. So enthalten die zuerst eluierbaren basischen Fraktionen immer mehrere Peptide gleichzeitig. Um diese schlechte Auftrennung zu verbessern, wurde durch Erhöhung des Äquilibrierungs-pH von 8,1 auf 8,4 eine gesteigerte ionale Absorption der basischen Peptide durch den Austauscher versucht. Aus dem gleichen Grund geschah die Auftragung des tryptischen Peptidgemisches bei pH 9,8. Da die Ausbeute einzelner Peptide nur

60% betrug, versuchten wir diese durch einige Modifikationen zu steigern: Anstelle der langen Standardsäule 1,8x150 cm kam bei gleicher Kapazität und Auftrennung eine kürzere 1,8x80 cm Säule zur Anwendung. Gleichzeitig wurde die Basenkonzentration auf 6% bzw. auf 9% erhöht und während des ganzen Laufes konstant gehalten bzw. sogar noch bei den sauren Fraktionen erhöht. So wurden die Peptide mit pH- und Salzgradienten eluiert. Zu dem Vorteil einer höheren Ausbeute gesellte sich nun noch der eines geringeren Elutionsvolumens, so daß die Dauer und die Fraktionszahl eines Laufes wesentlich verkürzt werden konnten. Dabei mußte auch das einzelne Fraktionsvolumen verkleinert werden.

Wenn es galt, bei einem Lauf nur bestimmte Peptide zu isolieren oder einen raschen Überblick über die qualitative Aminosäurezusammensetzung der einzelnen Fraktionsgipfel zu gewinnen, wurden aliquote Teile (1/100, 1/200) der Fraktionen totalhydrolysiert und im eindimensionalen Papierchromatogramm angefärbt.

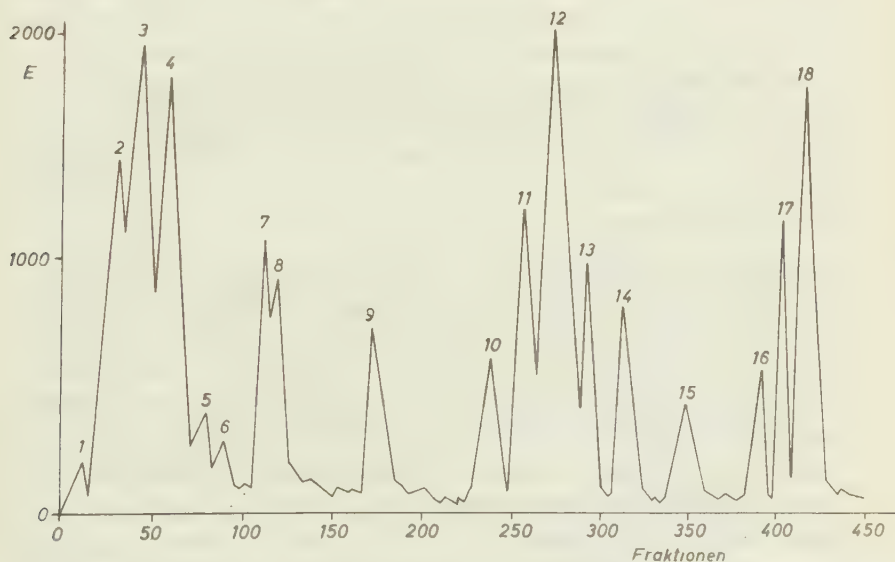


Abb. 7: Säulenchromatographische Auftrennung der tryptischen Peptide aus ungetrenntem Globin des Schwein-Hämoglobins über Dowex 1x2, 200-400 mesh
Säulenmaße: 1,8x150 cm Standardversuchsbedingungen

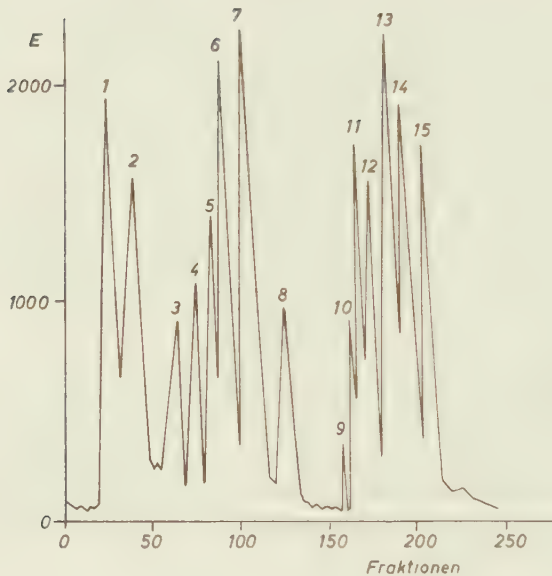


Abb. 8: Säulenchromatographische Auftrennung der tryptischen Peptide aus der α -Kette des Schwein-Hämoglobins über Dowex 1x2, 200-400 mesh
Säulenmaße: 1,8x80 cm Standardversuchsbedingungen

c) Rechromatographien

Voraussetzung zur "Vermessung" der Hydrolysate tryptischer Peptide ist Reinheit und Einheitlichkeit der Fraktion. Da fast alle Gipfel eines Laufes mehrere Peptide enthalten und da ein schlecht definierbarer, sog. "background" bestehend aus ungespaltenem und unspezifisch gespaltenem Material über den ganzen Lauf eluiert wird, sind brauchbare Analysen von direkt aus dem Dowex 1x2-Lauf entnommenen Hydrolysen nicht zu erhalten. Dieser Umstand macht eine Rechromatographie der Fraktionsgipfel notwendig.

Papierchromatographie

Die einfachste Methode zur Reinigung von Peptiden ist die präparative Trennung in der eindimensionalen Papierchromatographie. Am geeignetsten erwies sich das absteigende System Butanol/Eisessig/Wasser 4:1:5. Fast ebenso gut anwendbar kann in bestimmten Fällen die präparative Durchführung einer Hochspannungselektrophorese mit Papier als Träger sein.

Alle diese Papiermethoden haben jedoch den erheblichen Nachteil einer sehr geringen Kapazität von nur wenigen mol, so daß die Menge nur für die Durchführung einer einzigen Analyse ausreicht. Weiterhin ist der zum Teil hohe Verlust durch Adsorption an das Papier ungünstig, welche die Eluierbarkeit sehr erschwert. Ein weiterer Nachteil der Papiermethoden stellt die teilweise Zerstörung der terminalen Aminosäure durch die Ninhydrin-Sprühreaktion dar, die zur Sichtbarmachung des Peptides auf dem Papier erforderlich ist.

Säulenchromatographie

Wegen der Nachteile der Papierchromatographie wurde die systematische Verwendung der Säulenchromatographie erprobt. Zu diesem Zwecke mußten die Elutionsflüssigkeiten und Säulenmaße standardisiert werden. Nach der Anwendung eines Anionenaustauschers im Dowex 1x2-Lauf, aus dem die tryptischen Peptide stammen, ist es sinnvoll, einen Kationenaustauscher zu verwenden. Es standen hierfür Dowex 50x2 und phosphorylierte Cellulose zur Verfügung. Die Anwendung von kleinen 15x1 cm-Säulen mit Dowex 50x2 verkürzte die Dauer einer Rechromatographie wesentlich. Mit diesem Harz konnten saure und neutrale Peptide erfolgreich gereinigt werden. Jedoch erfordert diese Säule zur Regeneration die Herausnahme des Harzes aus der Säule und eine mehrstündige Entgasung des Harzes und der Elutionsflüssigkeiten.

Gegenüber Dowex 50x2 bietet der Austauscher phosphorylierte Cellulose größere Vorteile. Sein Anwendungsbereich ist breiter, der Bau einer Säule einfacher, Durchführung des Versuches und Regeneration der Säule ebenfalls. Der bei diesem

Austauscher mitspielende Molekularsiebeffekt erlaubt die Trennung verschieden großer Peptide, deren Ladung gleich oder ähnlich ist.

Bei den Rechromatographien der tryptischen Peptide des Esel-Hämoglobins wurden erstmals extrem dünne Säulen mit phosphorylierter Cellulose mit einem Durchmesser von 0,7 cm benützt. Gleichzeitig wurde die Pyridin-Molarität von 0,1 m auf 0,05 m und das pH von 3,0 auf 2,5 bei der Äquilibrierung der Säule gesenkt. Entsprechend waren auch die Gradienten zu verändern. Mit diesen Säulen gelang sodann auch die Rechromatographie von basischen, neutralen und insbesondere saueren Peptiden.

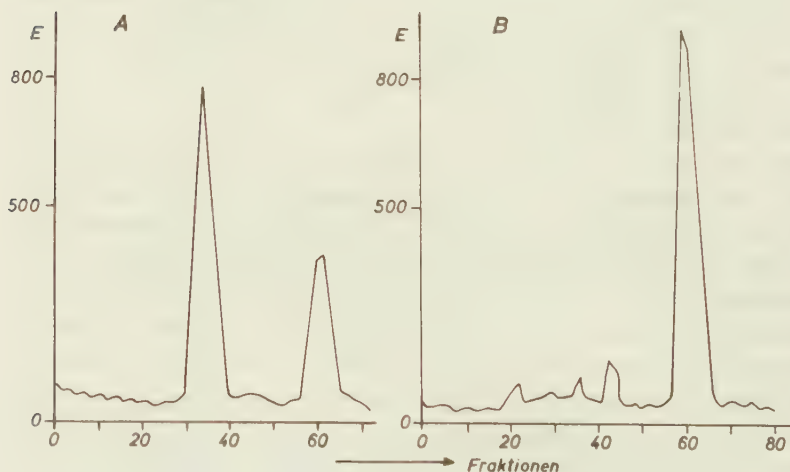


Abb. 9: Säulenchromatographische Rechromatographie über Dowex 50x2, 200-400 mesh der Fraktionsgipfel 11.) und 12.) aus dem tryptischen Lauf mit Gesamtglobin des Schwein-Hämoglobins
Säulenmaße: 1,0x15 cm Standardversuchsbedingungen

A: Fraktionsgipfel 11.)

B: Fraktionsgipfel 12.)

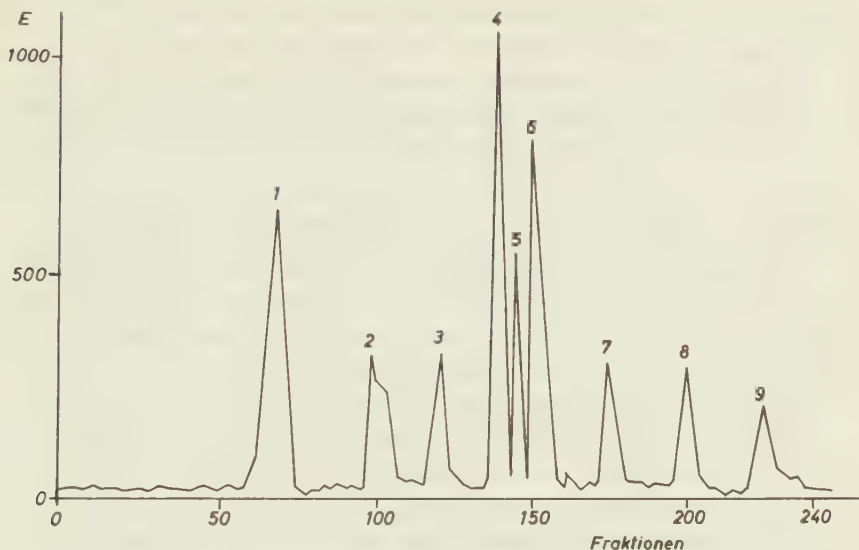


Abb. 10: Säulenchromatographische Rechromatographie über phosphorylierte Cellulose des Fraktionsgipfels 5.) aus dem tryptischen Lauf mit Gesamtglobin des Esel-Hämoglobins
Säulenmaße: 0,7x60 cm Standardversuchsbedingungen

Die Leistungsfähigkeit der einzelnen Rechromatographie-Methoden über Papier oder auf der Säule wurde bei der Aufarbeitung des tryptischen Laufes der α -Kette des Schwein-Hämoglobins verglichen. Zuerst erfolgte eine Rechromatographie der neutralen und sauren Peptide über Phos.-Cellulose. Dabei war die Auftrennung in einigen Fällen ungenügend. Die Reinigung gelang nur mittels präparativer Papierchromatographie. Der methodische Vergleichsversuch mit einer Dowex 50x2-Säule, der sich an die erste Säulenchromatographie mit Phos.-Cellulose anschloß, führte zwar zur Trennung der einzelnen Peptide, die Analysenwerte waren jedoch nicht so gut, wie diejenigen von über Papier gewonnenen Hydrolysen.

Diese methodischen Vergleiche bei der Rechromatographie von tryptischen Peptiden lassen erkennen, daß sowohl die präpara-

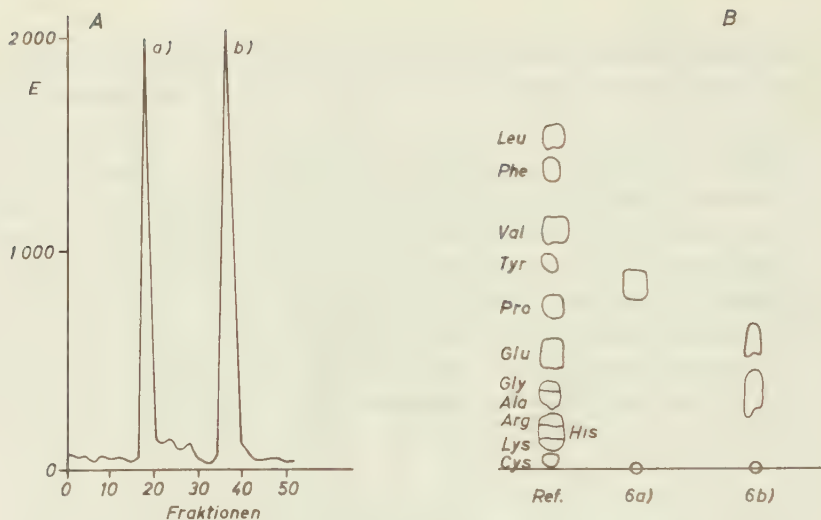


Abb. 11: A: Säulenchromatographische Rechromatographie über phosphorylierte Cellulose des Fraktionsgipfels 6.) aus der α -Kette des Schwein-Hämoglobins Standardversuchsbedingungen
B: Übersichtspapierchromatogramm der über phosphorylierte Cellulose fraktionierten Peptide des Fraktionsgipfels 6.)

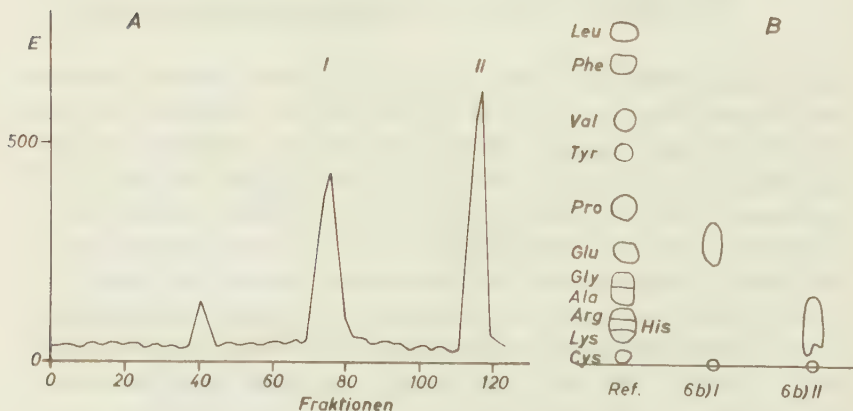


Abb. 12: A: Säulenchromatographische Rechromatographie über Dowex 50x2 des Fraktionsgipfels 6b.) aus der Rechromatographie über phosphorylierte Cellulose Standardversuchsbedingungen
B: Übersichtspapierchromatogramm der über Dowex 50x2 fraktionierten Peptide des Fraktionsgipfels 6b.)

tive Papierchromatographie als auch die Säulenchromatographie mit verschiedenen Austauschern in bestimmten Fällen das optimale Rechromatographie-Verfahren darstellen können, dessen Leistungsoptimum von Peptid zu Peptid verschieden ist und erst durch den Versuch gefunden werden kann.

d) Die quantitative Vermessung der Spaltprodukte

Der entscheidende Schritt zur Aufstellung der Summenformel eines tryptischen Peptides ist die Vermessung des Hydrolysats im automatischen Analysator. Voraussetzung hierfür ist ein hoher Grad von Reinheit des Peptids, welche im eindimensionalen Papierchromatogramm oder in der eindimensionalen Hochspannungselektrophorese getestet werden kann. Eine zweite Bedingung ist eine für die Vermessung optimale Menge des Hydrolysats, die ein bis drei μmol beträgt. Diese Menge kann im eindimensionalen Papierchromatogramm mit der standardisierten Ninhydrinreaktion gut abgeschätzt werden, das man mit einem zehntel Teil des Hydrolysats durchführt.

Eine weitere Schwierigkeit beim Arbeitsabschnitt der Vermessung stellt die Wahl der optimalen Hydrolysendauer dar. Das schon bei den "Kettenanalysen" auftretende Problem findet sich auch bei der Vermessung größerer tryptischer Peptide. Die folgende Gegenüberstellung der Werte aus einer 20-std. Hydrolyse und einer 70-std. Hydrolyse desselben Peptids zeigt die Verbesserung der Werte:

αST_{9b}	20-std.	αST_{9b}	70-std.
Lys	1,08	Lys	1,04
His	2,94	His	2,96
Asp	2,87	Asp	3,06
Ser	1,93	Ser	1,87
Pro	1,12	Pro	1,12
Gly	1,99	Gly	2,07
Ala	3,93	Ala	3,93
Val	1,11	Val	1,10
Leu	4,67	Leu	5,08

III. Partialformel der tryptischen Peptide des Schwein-Hämoglobins

Sowohl die Arbeiten von Perutz (14) über den räumlichen Bau der Hämoglobine von Pferd und Mensch, als auch die Untersuchungen an den Primärstrukturen verschiedener Säugetier-Hämoglobine zeigen, daß ein gleiches Bauprinzip allen Säugetier-Hämoglobinen eigen ist. Diese weitgehende Übereinstimmung in der Struktur des Moleküls ermöglicht die Aufstellung einer Partialformel in enger Analogie zum Human-Hämoglobin.

Der erste Schritt zur Aufstellung einer Partialformel stellt die Erkennung der analogen tryptischen Peptide dar. Die Zahl der auftretenden Peptide ist durch die strenge enzymatische Spezifität des Trypsins abhängig von der Anzahl der Lysine und Arginine in beiden Ketten. So ist in der α -Kette des Schwein-Hämoglobins ein Lysyl-Peptid, in der β -Kette je ein Lysyl- und Arginyl-Peptid mehr vorhanden als im Human-Hämoglobin. Diese Austausche und weitere innerhalb der einzelnen tryptischen Peptide machen eingehendere Untersuchungen für die Erkennung und Einordnung der tryptischen Spaltprodukte erforderlich. Hierbei müssen sequenzanalytische Methoden angewendet werden, deren wichtigste im wesentlichen zwei sind: für kleine Peptide ist der Abbau nach Edman geeignet, bei größeren Peptiden die Nachspaltung mit einem weiteren Enzym angebracht, welche zu kleineren Bruchstücken führt. Die nicht strenge enzymatische Spezifität der hierfür verwendeten Enzyme führt oft zu Überlappungen. Diese und die Anwendung des Edman-Abbaus an den sekundären Spaltprodukten ermöglichen das Erkennen von tryptischen größeren Peptiden und die Zuordnung derselben zu den jeweiligen analogen Sequenzen des Human-Hämoglobins.

α -Kette

In der nachfolgenden Tabelle 2 wurden die tryptischen Peptide der α -Ketten von Mensch- und Schwein-Hämoglobin zusammengestellt. Kriterien für die Erkennung von tryptischen Peptid-Analogen sind identische Peptidgröße und der Gehalt des Peptides an charakteristischen Aminosäuren. Auf diese Weise kann-

Tabelle 2: Tryptische Peptide der α -Kette von Mensch und Schwein

	I_1		I_2		I_3		I_4		I_5		I_6		I_7		I_8		I_{9a+b}		I_{10}		I_{11}		I_{12}		I_{13}		I_{14}	
	H	S	H	S	H	S	H	S	H	S	H	S	H	S	H	S	H	S	H	S	H	S	H	S	H	S	H	S
Lys	1	1	1	1	1	1	-	-	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	-	-	1	1	1	1	-	-	
His	-	-	-	-	-	-	1	1	-	-	2	2	1	1	-	-	3	-	3	-	-	-	3	3	-	-	-	
Arg	-	-	-	-	-	-	1	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	1	-	-	-	-	-	1	1	
Asp	1	1	1	1	-	-	-	-	-	-	-	1	2	-	-	-	6	1	3	-	2	2	1	4	-	-	-	
Thr	-	-	1	-	-	-	-	-	2	2	1	1	-	-	-	-	1	1	-	-	-	-	2	1	2	-	-	
Ser	1	1	-	-	-	-	-	-	1	-	2	2	-	-	-	-	2	-	2	-	-	-	2	3	3	-	-	
Glu	-	-	-	-	-	-	3	3	-	-	1	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	1	-	-	-	
Pro	1	-	-	-	-	-	-	-	1	1	1	1	-	-	-	-	1	-	1	-	1	1	2	2	-	-	-	
Gly	-	-	-	-	1	1	3	4	-	1	1	1	2	2	-	-	-	2	-	-	-	-	-	1	-	-	-	
Ala	1	2	-	1	2	2	4	4	-	-	-	1	-	-	-	-	7	2	4	-	-	-	5	3	1	-	-	
Cys	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	1	-	-	-	
Val	1	1	1	1	-	-	1	1	-	-	1	1	-	-	-	-	3	1	1	-	2	2	2	2	2	-	-	
Met	-	-	-	-	-	-	-	-	1	1	-	-	-	-	-	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
Leu	1	1	-	-	-	-	1	1	1	1	1	1	-	-	-	-	4	1	5	1	1	-	7	5	2	-	-	
Ileu	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
Tyr	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	1
Phe	-	-	-	-	-	-	-	-	2	2	2	2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
Try	-	-	-	-	-	1	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	1	1	1	1	-	-	
Summe:	7	7	4	4	5	5	15	15	9	9	16	16	4	4	1	1	29	7+22	2	2	7	7	26	28	12	2	2	

ten die zu Human-Hämoglobin analogen Peptide der α -Kette im Schwein-Hämoglobin bis auf die Peptide αTp_1 , αTp_9 und αTp_{11} ohne weitere Untersuchungen an den Peptiden angegeben werden.

Die Peptide αTp_1 und αTp_{11} sind bei Human-Hämoglobin Heptapeptide, das Peptid αTp_9 hat beim Menschen 29 Aminosäurenreste. Demgegenüber konnten im Schwein-Hämoglobin drei Heptapeptide und ein 22er-Peptid gefunden werden.

Die drei Heptapeptide des Schwein-Hämoglobins erschienen gemeinsam in der Dowex 1x2-Säulenchromatographie ungetrennt in einem Gipfel. Die Trennung des Peptidgemisches aus diesem Gipfel gestaltete sich sehr schwierig und ergab nur schlechte Analysenwerte. Um eindeutige Analysen dieser Peptide zu erhalten, wurde ein gesonderter tryptischer Lauf durchgeführt, der durch einen Elutionsbeginn bei pH 7,8 die basischen Peptide unberücksichtigt ließ. Besonders schwache Gradienten sollten die Neutralpeptide besonders stark auftrennen. Bei diesem Dowex 1x2-Lauf zeigte sich der erste Neutralgipfel in zwei Gipfel aufgespalten.

Das eindimensionale Papierchromatogramm der getrennt herausgenommenen Fraktionen 1₁ und 2₁ ließ je zwei Peptide mit geringem R_f -Wert-Unterschied erkennen. Die präparative Trennung über Papier ergab in der Fraktion 1₁ zwei in ihrer Bruttoformel sehr ähnliche Peptide mit nur einem Serin-Threonin-Unterschied, in der Fraktion 2₁ ein Prolyl-Heptapeptid und das Threonylpeptid der Fraktion 1₁. Durch einen dreistufigen Edman-Abbau liessen sich die Partialformeln des Threonyl und des Seryl-Peptides ermitteln:

Val-Leu-Ser-(Ala,Ala,Asp,Lys)

Val-Ala-Asp-(Ala,Leu,Thr,Lys)

Damit war eine Korrelation der beiden Peptide zu analogen Bereichen des Human-Hämoglobins hergestellt. Das Seryl-Peptid erwies sich als das N-terminale der α -Kette, während das Threonyl-Peptid dem N-terminalen Bereich jener Region entspricht, das im Human-Hämoglobin von dem 29er Peptid αTp_9 eingenommen wird. Der in der α -Kette des Schwein-Hämoglobins zu-

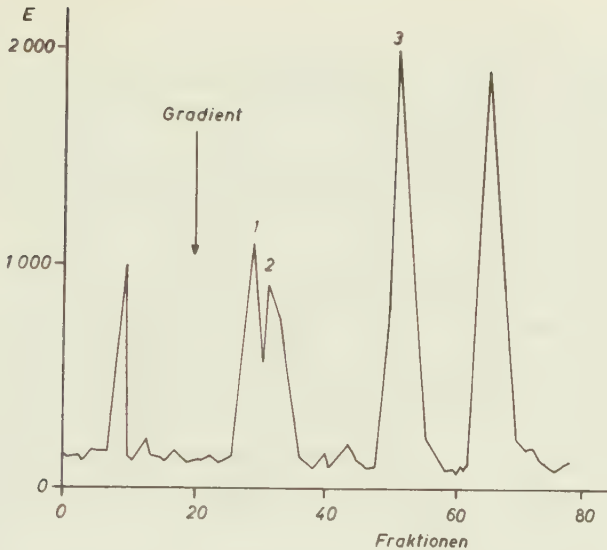


Abb. 13: Säulenchromatographische Auftrennung der tryptischen Neutral-Peptide aus der α -Kette des Schwein-Hämoglobins
Versuchsbedingungen: Säulenmaße: 80x2,0 cm
Austauscher: Dowex 1x2, 200-400 mesh
Äquilibriumierung: 2% Pyr., 2% Coll., 2% Lut. pH 7,8
Gradient: 2% Pyr., 2% Coll., 2% Lut. pH 7,0

sätzlich gefundene Lysylrest führt demnach zu einer Aufspaltung des ursprünglichen 29er Peptides in ein Heptapeptid und ein 22er Peptid. Ähnliche Aufspaltungen dieses Peptides finden sich auch beim Hämoglobin des Kaninchens und des Lamas. Für das dritte Heptapeptid im Schwein-Hämoglobin, das Prolyl-Peptid, ließ sich nach dem Vorliegen einer eindeutigen Analyse die Entsprechung zum Peptid αTp_{11} des Human-Hämoglobins finden.

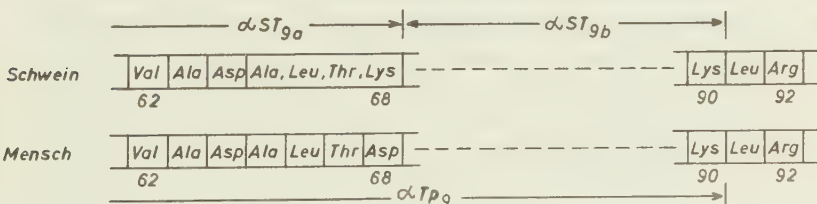


Abb. 14: Vergleich der Sequenzbereiche von Position 62 bis Position 92 der α -Ketten von den Hämoglobinen des Menschen und des Schweins

β -Kette

Bei der Aufstellung einer Partilaformel der β -Kette des Schwein-Hämoglobins zeigte es sich, daß zu den tryptischen Peptiden βTp_9 , βTp_{10} , βTp_{11} , βTp_{12} und βTp_{13} des Human-Hämoglobins analoge Peptide nicht vorhanden waren. Es fanden sich dagegen beim Schwein drei neu auftretende Lysylpeptide, zwei sehr ähnliche Lysylpeptide mit einem zusätzlichen Arginin als einzigem Unterschied und ein ebenfalls bei Human-Hämoglobin nicht vorkommendes Cystein-haltiges Argininpeptid. Aus diesen Befunden mußte für den Bereich Pos. 67 bis Pos. 132 der β -Kette beim Schwein-Hämoglobin ein beim Human-Hämoglobin anderer Bau der Kette rekonstruiert werden. Das Ergebnis dieses Versuches wird im folgenden erläutert und findet sich in der Tabelle der tryptischen Peptide von Mensch- und Schwein-Hämoglobin.

Das Peptid βTp_9 zerfällt durch den Eintritt eines Lysins in Pos. 76 in zwei neue tryptische Peptide βST_{9a} und βST_{9b} .

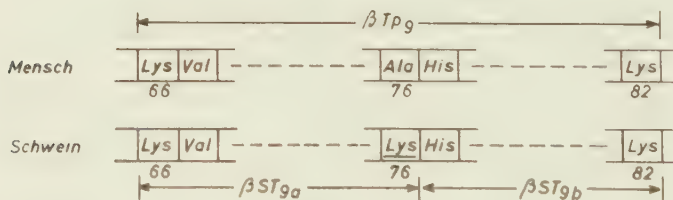


Abb. 15: Sequenzbereiche von Pos. 66 bis Pos. 82 der β -Kette von Human-Hämoglobin und Schwein-Hämoglobin

An den neuen Teilpeptiden wurde zur Sicherung ihrer Stellung in der β -Kette ein Edmanabbau durchgeführt. Die Vermessung der Restpeptide ergab folgende Analysen:

β ST _{9a}		β ST _{9b}	
Lys	0,93	Lys	0,89
Asp	1,09	His	0,33 (Edman)
Ser	2,01	Asp	1,93
Glu	1,03	Leu	2,08
Gly	1,02		
Val	0,18 (Edman)		
Leu	1,98		
Phe	0,88		

In den ersten saueren Gipfeln des tryptischen Dowex lx2-Laufes mit β -Kettenmaterial fand sich ein Cystein-haltiges Peptid mit dem Rf-Wert 0. Dieses lösliche Peptid wurde nach Oxydation mit Perameisensäure auf einer Phos.-Cellulose-Säule rechromatographiert und anschließend vermessen. Auf Grund der charakteristischen Aminosäuren Arginin, Prolin und dem einzigen Cystein der β -Kette des Schwein-Hämoglobins war die Zuordnung dieses Peptides zum analogen Bereich der Human- β -Kette nicht schwierig. Es umfaßt die Sequenzen Pos. 88 bis Pos. 104. Damit gehen die Bereiche der Peptide β TP₁₁ und β TP₁₀ des Human-Hämoglobins in das neue Peptid des Schwein-Hämoglobins ein.

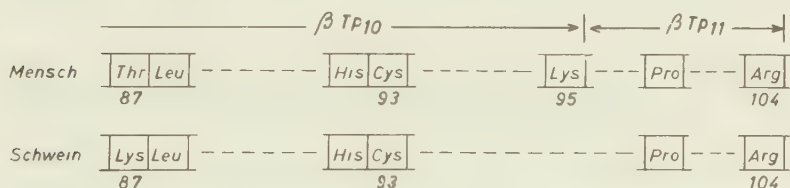


Abb. 16: Sequenzbereiche von Pos. 87 bis Pos. 104 der β -Kette von Human-Hämoglobin und Schwein-Hämoglobin

Der Threonin-Lysin-Austausch in Pos. 87 konnte durch das Auffinden eines Lysyl-Pentapeptides gesichert werden, das in den Bereich der Positionen 83 bis 87 paßt. Dieses Peptid wurde aus dem zweiten basischen Gipfel der Dowex lx2-Chromatographie isoliert. Damit konnte das dritte des beim Schwein-Hämoglobin neu auftretende Lysyl-Peptid in die Kette eingeordnet werden.

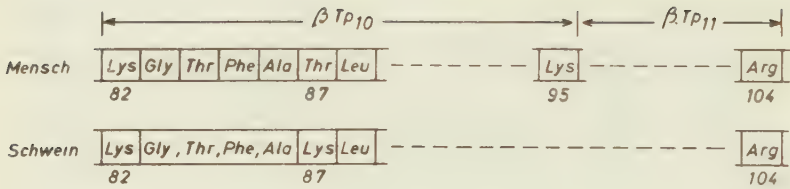


Abb. 17: Sequenzbereiche von Pos. 82 bis Pos. 104 der β -Kette von Human-Hämoglobin und Schwein-Hämoglobin

Aus den Fraktionsgipfeln 5₁ und 9₁ des tryptischen Laufes der β -Kette wurden zwei Lysyl-Peptide vermessen, deren Summenformeln sich nur durch ein zusätzliches Arginin bei Peptid 5₁ unterscheiden. Für beide Peptide gab es keine Analogie bei Human-Hämoglobin. Um eine Homologität der beiden Peptide zu beweisen oder auszuschließen, erfolgte an beiden Fällen unter gleichen Bedingungen eine 9-stündige peptische Spaltung. Anschließend wurden beide Peptide über zwei 60x0,7 cm-Säulen, gefüllt mit Phos.-Cellulose, unter gleichen Bedingungen getrennt. Aus diesen beiden Versuchen konnten zwei identische und zwei sich wiederum nur durch ein zusätzliches Arginin unterscheidende peptische Spaltprodukte isoliert und analysiert werden.

Tabelle 3: Summenformeln der tryptischen Peptide 9₁ und 5₁ der β -Kette und deren peptische Nachspaltungsprodukte

	tryptische Peptide			peptische Nachspaltung		
	9	5	9b	5c	9c	5d
Lys	1	1	—	—	1	1
His	1	1	1	1	—	—
Arg	—	1	—	1(Edman:0)	—	—
Asp	3	3	3	3	—	—
Glu	2	2	1	1	1	1
Pro	1	1	1	1	—	—
Gly	1	1	1	1	—	—
Ala	2	2	—	—	2(Edman:1)	2(Edman:1)
Val	1	1	1	1	—	—
Leu	1	1	1	1	—	—
Phe	2	2	1	1	1	1
Summe :	15	16	10	11	5	5

Die Tabelle 3 zeigt, daß die peptischen Spaltstücke 9c₁ und 5d₁ die gleiche Summenformel besitzen mit der gleichen Aminosäure Alanin als N-Terminus. Die peptischen Peptide 9b₁ und 5c₁ unterscheiden sich nur durch das Arginin bei Peptid 5c₁, welches in N-terminaler Position vorliegt. Somit ist das tryptische Peptid 5₁ als homologes, ditryptisches zum Peptid 9₁ aufzufassen. Überlappende Sequenzen aus dem β -"Core" weisen den beiden homologen Peptiden die Positionen 118 bzw. 119 bis 132 zu.

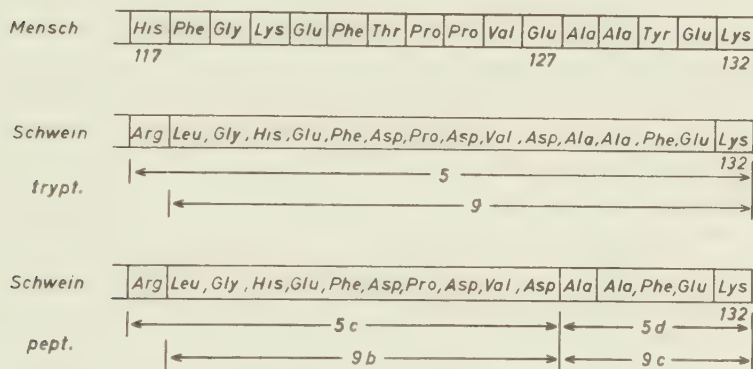


Abb. 18: Sequenzbereiche von Pos. 117 bis Pos. 132 der β -Kette von Human-Hämoglobin und Schwein-Hämoglobin

Die N-terminalen Peptide beider Ketten konnten durch einen Edman-Abbau der Aminosäure Valin gesichert werden.

α ST ₁		β ST ₁	
Lys	1,00	Lys	1,03
Asp	1,05	His	0,89
Ser	0,93	Ser	1,06
Ala	1,98	Glu	1,89
Val	0,42 (Edman)	Ala	1,04
Leu	1,01	Val	0,73 (Edman)
		Leu	1,09

Die terminale Position des Valins in beiden Ketten ließ sich durch die N-Terminus-Abspaltung von Valin am ungetrennten Kettenmaterial nach der Cyanatmethode bestätigen.

Tabelle 4: Tryptische Peptide der β -Kette von Mensch und Schwein

	T ₁		T ₂		T ₃		T ₄		T ₅		T ₆		T ₇		T ₈		T _{9a b}		T ₁₀		T ₁₁		T _{12a b}		T ₁₃		T ₁₄		T ₁₅		
	H	S	H	S	H	S	H	S	H	S	H	S	H	S	H	S	H	S	H	S	H	S	H	S	H	S	H	S	H	S	
Lys	1	1	1	2	-	-	-	-	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	-	-	1	-	1	1	1	1	-	-	
His	1	1	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	1	1	-	-	1	-	1	1	2	-	1	2	-	1	1	1	1	1	
Arg	-	-	-	-	1	1	1	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	1	1	-	-	-	-	-	-	-	
Asp	-	-	-	-	2	2	-	-	3	4	-	-	-	-	-	-	3	1	2	1	2	3	1	-	-	3	1	1	-	-	
Thr	1	-	1	-	-	-	1	1	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2	1	-	-	-	1	-	-	-	-	-	-	
Ser	-	1	1	1	-	-	-	-	2	2	-	-	-	-	-	-	1	2	1	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
Glu	2	2	-	3	2	2	1	1	1	1	-	-	-	-	-	-	-	1	1	1	1	3	-	-	3	2	-	-	-	-	
Pro	1	-	-	-	-	-	1	1	2	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	1	-	-	2	1	-	-	-	-	
Gly	-	-	1	2	3	3	-	-	2	2	-	-	1	1	-	-	2	1	-	1	-	-	2	1	-	1	1	1	-	-	
Ala	-	1	2	2	1	1	-	-	1	2	-	-	1	1	-	-	2	-	1	1	-	-	1	1	-	2	2	4	4	-	
Cys	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	-	-	1	1	-	-	-	-	-	-	-	
Val	1	1	1	2	3	3	2	2	1	1	1	1	-	-	-	-	1	1	-	-	1	1	3	4	-	1	1	3	3	-	
Met	-	-	-	-	-	-	-	-	1	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
Leu	1	1	1	3	1	1	2	2	1	1	-	-	-	-	-	-	4	2	2	-	1	3	4	3	-	-	1	1	1	-	
Ileu	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	-	-	-	-	-	-	
Tyr	-	-	-	-	-	-	-	1	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	-	-	-	1	1
Phe	-	-	-	-	-	-	-	-	-	3	3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	2	-	-	-	-
Try	-	-	1	1	-	-	1	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	1	1	1	1	-	-	-	-	-	-	-	
Summe	8	8	9	17	13	13	10	10	19	19	2	2	4	4	1	1	16	10+6	13	5	9	17	16	12+1	12	15	12	12	2	2	

IV. Die unlöslichen tryptischen Peptide

Rund ein Drittel der Aminosäuresequenzen beider Ketten ist nach der tryptischen Verdauung am isoelektrischen Punkt (pH 6,4) unlöslich. Dieser unlösliche Anteil, das sog. "Core", erweist sich als nicht homogen. Neben einem Anteil von ungespaltenem Kettenmaterial werden definierte tryptische Spaltprodukte gefunden. Diese "Core"-Peptide sind äußerst schwerlöslich. Die Ursache der Schwerlöslichkeit scheint nicht so sehr der Gehalt an Cystein zu sein, welche zu S-S-Vernetzung führen könnte, da aus dem löslichen tryptischen Überstand der β -Kette ein Cystein-Peptid isoliert werden konnte. Vielmehr darf als Grund der Schwerlöslichkeit eine Anhäufung neutraler, mit sperrigen Seitenketten versehenen Aminosäuren angenommen werden. Zudem ist - auf Grund einiger Trypsin-resistenter Bindungen - die Größe der "Core"-Peptide sehr beträchtlich (beim α - "Core" 41 Aminosäuren), so daß diese Peptide Eiweißcharakter besitzen, der wohl zur Ausbildung von Lösungs-ungünstigen Tertiärstrukturen führt. Das "Core"-Problem ist also im wesentlichen ein Problem der Löslichkeit. Da nicht gelöste Peptide weder über Papier noch über die Säule chromatographiert werden können, ist eine Auftrennung und Isolierung dieser Peptide nicht möglich.

a) Oxydation mit Perameisensäure

Die Oxydation der Cystein- bzw. Cystin-Reste von Peptiden zu Cysteinsäure-Resten hat einen zweifachen Sinn: einmal werden S-S-Brückenbildungen und Peptidvernetzungen verhindert und rückgängig gemacht, zum anderen werden Löslichkeit und Hydrolyse-Beständigkeit des Peptides erhöht. So können Cystein-haltige Peptide nur in der Cysteinsäure-Form vermessen werden. Die Oxydation wird am schonendsten mit Perameisensäure in der Kälte durchgeführt.

Zweckmäßigerweise steht am Anfang aller Arbeiten am "Core" die Oxydation. Allerdings wird dabei Tryptophan zerstört. Es ist deshalb angebracht, sich vor der Oxydation mittels eines

spezifischen Sprühtests zu vergewissern, ob diese Aminosäure vorhanden ist. Die Oxydation mit Perameisensäure ging also allen Versuchen der Trennung von α - und β -"Core", allen chymotryptischen und peptischen Spaltungen am "Core", sowie allen Vermessungen von Cystein-haltigem Material (Ketten und Peptide) voraus.

b) -SH-Blockierung mit Jodacetamid

Durch die Blockierung mit Jodacetamid wird ebenfalls die S-S-Brückenbildung verhindert. Die Alkylierung der SH-Gruppen erfolgt im basischen Milieu, wo die ϵ -Aminogruppen des Lysins und der Imidazolring des Histidins keine Veränderung erfahren. Das carboxyamidomethylierte Globin wurde der tryptischen Verdauung unterzogen. Die Spaltungsdauer von 2 Stunden erwies sich jedoch als unzureichend, so daß bei der tryptischen Nachspaltung des ausgefällten "Core" ein beträchtlicher Anteil von ungespaltenem Material erst jetzt gespalten wurde und in die "Core"-Fraktion einging. Diese Beimengung von löslichen tryptischen Peptiden machte eine Erkennung und Isolierung von "Core"-Peptiden unmöglich.

c) Tryptische Nachspaltung

Als weitere Möglichkeit zur Lösung des "Core"-Problems schien erfolgversprechend, die Ausbeute bei der tryptischen Spaltung durch pH-Erhöhung und durch erneute Fällung und Verdauung zu verbessern.

So wurden 170 mg α -"Core" mit Perameisensäure oxydiert und einer tryptischen Nachspaltung unterzogen. Die Spaltung wurde anfangs bei +10 Grad und einem pH von 10,5 unter Zugabe nur der halben erforderlichen Trypsinmenge 45 Minuten lang gehalten. Dabei war ein pH-Abfall auf pH 9,3 zu registrieren. Anschließend wurde auf +35° erwärmt und unter Zugabe der restlichen Trypsinmenge 3 Stunden lang weitergespalten. Das gewonnene Hydrolysat wurde darauf hochtourig zentrifugiert. Die absteigende Papierchromatographie und die Hochspannungselektrophorese zeigten im Überstand der Nachspaltung ein His-positives Haupt-

spaltprodukt mit 2-3 Nebenbanden, im Sediment nur zwei schwache Flecken. Der Überstand der tryptischen Nachspaltung wurde über eine 15x1,0-Dowex 1x2-Säule mit hoher Basenkonzentration aufgetrennt. Nach 120 Fraktionen unter einem Gradienten von pH 4,5 kam ein Hauptgipfel mit einem kleinen Nachgipfel. Der Hauptgipfel erwies sich im Papierchromatogramm als nicht einheitlich; er konnte mit der Hochspannungselektrophorese präparativ gereinigt und nach einer 20-std. und einer 70-std. Hydrolyse vermessen werden. Aus beiden Analysenwerten konnte ein Cys-haltiges Peptid mit 28 Aminosäuren errechnet werden. Dieses Peptid entspricht dem α -"-Core"-Bereich Pos. 100-127. Somit konnte in diesem Arbeitsgang auf Grund einer Modifikation der tryptischen Nachspaltung das größte Peptid des α -"-Core" vermessen werden.

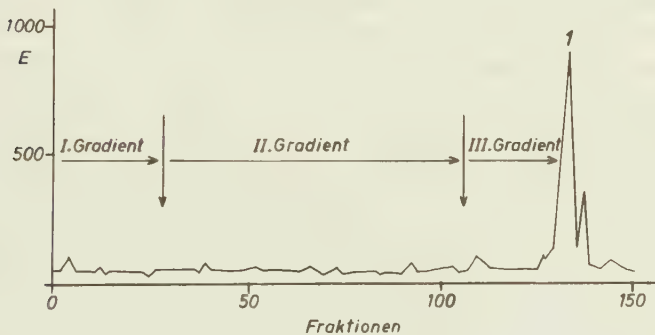


Abb. 19: Säulenchromatographische Auftrennung der tryptisch nachgespaltenen α -"-Core"
Versuchsbedingungen:
Austauscher: Dowex 1x2
Säulenmaße: 15x1,0 cm
Äquilib.: 2% Pyr., 2% α -Pic., 2% N-Methyl-Morpholin
pH 9,4
I Gradient: gleiche Basen pH 7,7
II Gradient: 4% Pyr., 2% α -Pic., pH 6,6
III Gradient: 4% Pyr., 2% α -Pic., pH 4,5

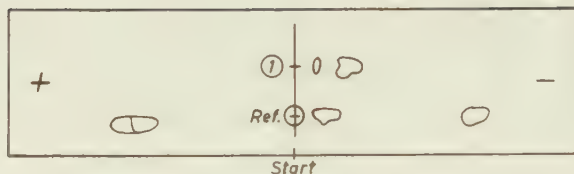


Abb. 20: Papierelektrophorese des Fraktionsgipfels (1) aus der Säulenchromatographie des tryptisch nachgespaltenen α -"Core"
Versuchsbedingungen: Puffer 5% Pyr-Acetat pH 6,4
Laufzeit 45 Min; Spannung 2500 V, 40 mA

d) Säulenchromatographie bei hoher Ionenstärke

Da "Core"-Peptide in wässrigen Lösungen mit hoher Ionenstärke löslich sind, schien der Versuch einer Säulenchromatographie mit Elutionspuffern großer Ionenstärke sinnvoll. Unter solchen Bedingungen führte jedoch die "Core"-Chromatographie über Ionenaustauschern zu keinen reinen Peptiden.

In einer anderen Versuchsreihe sollte die Anwendungsmöglichkeit des Molekularsiebeffektes von Sephadex G-25 für die "Core"-Chromatographie untersucht werden. Um eine Lösung des "Core" zu erreichen, wurde 50% Essigsäure als Lösungsmittel verwendet. Bei diesen Versuchen trat die Schwierigkeit auf, die Säulenläufe mit dieser hohen Essigsäurekonzentration zu vermessen, da eine Ninhydrinreaktion unter diesen Bedingungen in üblicher Weise nicht möglich ist. Nach vorausgegangener fast völliger Trocknung des aliquoten Teils konnte die Ninhydrinreaktion angewandt werden. Gleichzeitig wurde die Möglichkeit einer UV-Messung bei 280 m μ versucht. Beide Meßmethoden lieferten übereinstimmende Kurven. Der Trenneffekt von Sephadex G-25 war jedoch für eine analytische Reinheit nicht ausreichend.

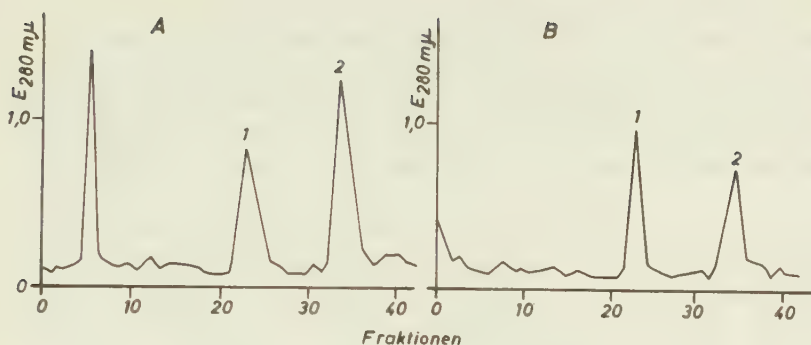


Abb. 21: Säulenchromatographische Auftrennung über Sephadex G-25 von 6 mg β -"Core" des Schwein-Hämoglobins

A: Extinktionsmessung bei 280 m μ

B: Extinktionsmessung bei 570 m μ nach Durchführung der Ninhydrinreaktion

e) Spaltungen des "Core"

Als der erfolgreichste, jedoch mühsamere Weg zur Lösung des "Core-Problems" erwies sich die Zerlegung der großen "Core"-Peptide in kleinere Spaltstücke. Dadurch erhält man definierte Bruchstücke von "Core"-Peptiden, die in den üblichen chromatographischen Lösungsmitteln löslich sind und somit isoliert und vermessen werden können. Der Prozentsatz an ungespaltenem Kettenmaterial im "Core" ist nach einer ausreichend langen Spaltungszeit von 6-8 Stunden so gering, daß er bei der "Core"-Nachspaltung molmäßig weit hinter den eigentlichen "Core"-Peptiden zurückbleibt.

α -"Core"

Die relative Größe des α -"Core" läßt eine Spaltung in nicht zu zahlreiche und zu kleine Spaltstücke sinnvoll erscheinen. Diese kann mit dem Ferment Chymotrypsin erreicht werden, dessen enzymatische Spezifität die C-Termini von Phe, Leu und His bevorzugt. Der Spaltung ging eine Oxydation mit Perameisensäure voraus. Nach einer Verdauungszeit von 90 Min. konnte bei pH 6,4

unlösliches Material ausgefällt werden, das noch einer zweimaligen chymotryptischen Nachspaltung unterzogen wurde. Auch nach diesen Nachspaltungen blieb ein Viertel des eingesetzten Materials unlöslich. Weitere Klärungsversuche an diesem Rest blieben erfolglos. Die Auftrennung des chymotryptischen Hydrolysates des α -"Core" erfolgte über eine Dowex 1x2-Säule.

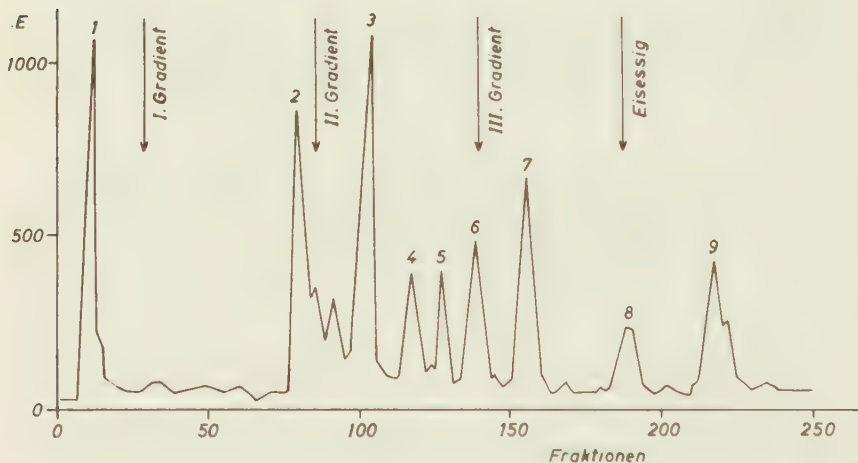


Abb. 22: Säulenchromatographische Auftrennung des chymotryptisch nachgespaltenen α -"Core"

Versuchsbedingungen:

Austauscher: Dowex 1x2, 200-400 mesh

Säulenmaße: 2,0x80 cm

Äquilibrierung: 2% Pyr., 2% Lut., 2% α -Pic.-Acetat
pH 7,8

I Gradient: 2% Pyr., 2% Lut., 2% α -Pic.-Acetat pH 6,6

II Gradient: " " " " pH 6,0

III Gradient: " " " " pH 4,0

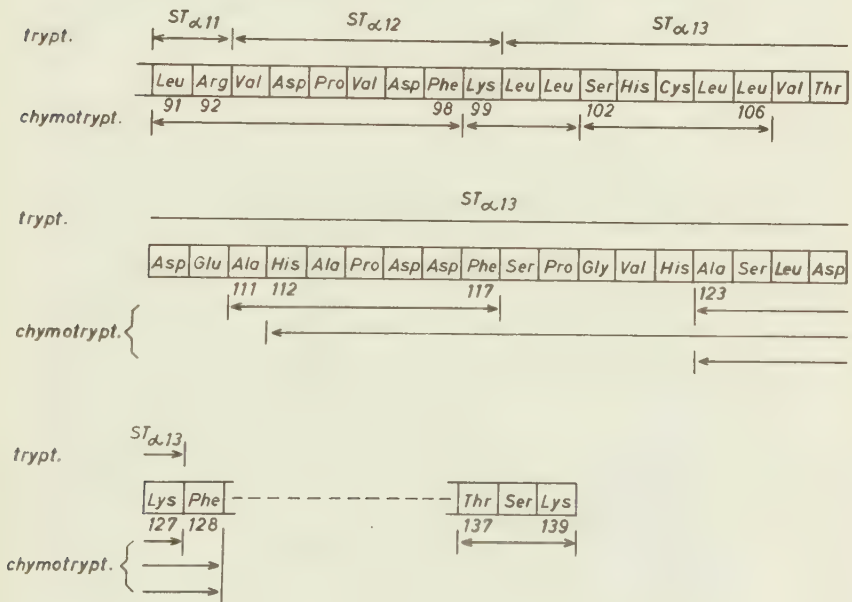
Alle Rechromatographien dieses chymotryptischen "Core"-Laufes wurden mit phosphorylierter Cellulose oder Dowex 50x2 ausgeführt. Die vermessenen chymotryptischen Peptide zeigen nur geringe Überlappung und ermöglichten die Rekonstruktion eines großen Teils des α -"Core"-Bereiches des Schwein-Hämoglobins. Das tryptische Peptid α ST₁₄ Pos. 128-139 konnte weder im lös-

lichen noch im unlöslichen Teil der tryptischen Spaltung gefunden werden. Es muß angenommen werden, daß es sich mit den angewandten Methoden nicht chromatographieren läßt. Ähnliche Schwierigkeiten traten bei diesem Peptid auch beim Hämoglobin des Lamas auf.

Partialformel des α -''Core''-Bereiches

Aus zwei Dowex lx2-Läufen mit chymotryptisch gespaltenen α -''Core'' liessen sich Peptide isolieren, mit denen sich folgende Partialformel konstruieren ließ:

Tabelle 5: Partialformel des α -''Core''-Bereichs



β - "Core"

Die Nachspaltung des unlöslichen Anteils des tryptischen Hydrolysates der β -Kette des Schwein-Hämoglobins wurde mit Pepsin durchgeführt. 150 mg β - "Core" wurden mit Perameisensäure oxidiert und 5 Stunden peptisch gespalten. Mit einer 60x1,0 cm-Säule gelang die Trennung über Dowex 1x2. Während des Laufes wurde die Basenkonzentration von 4,5% auf 15% gesteigert. Die anschließende Reinigung der Peptide geschah durch Papierchromatographie.

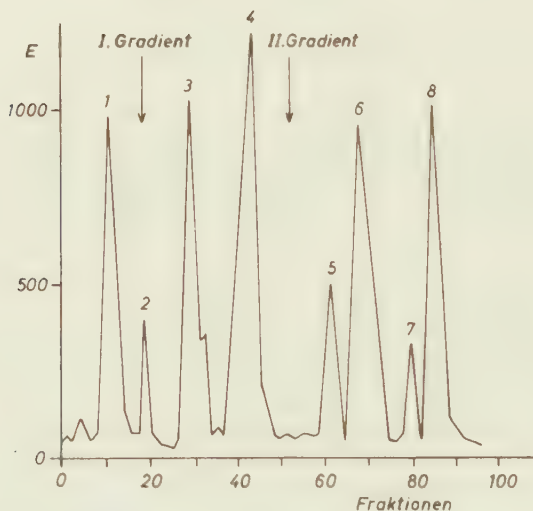


Abb. 23: Säulenchromatographische Auftrennung der peptisch nachgespaltenen β - "Core"

Versuchsbedingungen:

Austauscher: Dowex 1x2, 200-400 mesh

Säulenmaße: 60x1,0 cm

Äquilibr.: 1,5% Pyr., 1,5% Lut., 1,5% α -Pic-Acetat
pH 8,4

I Gradient: 6% Pyr., pH 6,0

II Gradient: 15% Pyr., pH 4,0

Die mit diesem Lauf erhaltenen Teilsequenzen des β - "Core" bestätigen die aus dem löslichen Überstand der tryptischen Spaltung vermessenen Peptide dieses Bereiches, des Cys-haltigen Arginyl-Peptides und der beiden homologen Peptide 5₁ und 9₁.

Partialformel des β -''Core''-Bereiches

Informationen über das β -''Core'' waren sowohl aus dem löslichen als auch aus dem unlöslichen tryptischen Hydrolysat zu erhalten. Auf Grund der zum Teil überlappenden peptischen Spaltstücke und mit Hilfe von chemischen und enzymatischen Aminosäuren-Abspaltungen konnten die Positionen von wichtigen Austauschen ermittelt werden. Im peptischen Spaltprodukt Pos. 112-116 (Val Val Leu Ala Arg) ist gegenüber Human-Hämoglobin das Cys in Pos. 112 gegen Val ausgetauscht. Der Edman-Abbau an diesem Peptid zeigt diesen Austausch.

Vermessung des Restpeptids nach Edman-Abbau, 40-std. Hydrolyse.

Arg	+
Ala	0,98
Val	1,56 (Edman)
Leu	1,04

Im peptischen Peptid Pos. 105-114 findet sich das einzige Isoleucin der β -Kette des Schwein-Hämoglobins. Die 12-stündige Einwirkung von Carboxypeptidase an diesem Peptid spaltete 6 Aminosäuren ab. Die vom C-Terminus her nächstfolgende Aminosäure ist mit großer Sicherheit das Säureamid der Asparaginsäure, welches bekanntermaßen die Weiter-spaltung der C-ase verhindert.

Vermessung des Restpeptides nach C-ase-Einwirkung.

Val	2,71
Ileu	1,04
Leu	2,24

Tabelle 6: Partialformel des β -"Core"-Bereichs

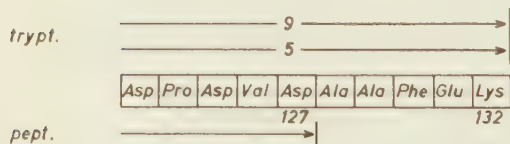
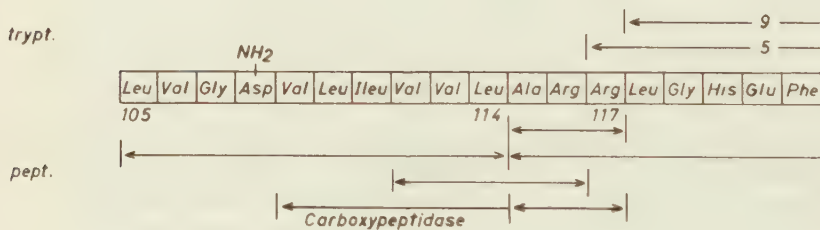
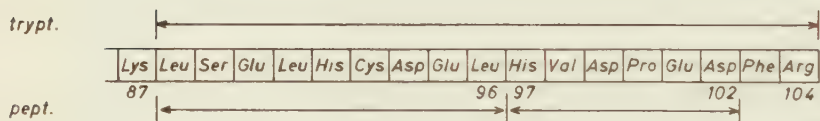


Tabelle 7: Partialformel der α -Kette des Schwein-Hämoglobins in Analogie zu Human-Hämoglobin

H	Val	Leu	Ser	Pro	Ala	Asp	Lys	Thr	Asp	Val	Lys	Ala	Ala	Try	Gly	Lys	Val	Gly	Ala	His	Ala	Gly	Glu	Tyr
S	Val	Leu	Ser	Ala	Ala	Asp	Lys	Ala	Asp	Val	Lys	Ala	Ala	Try	Gly	Lys	Val	Gly	Ala	His	Ala	Gly	Glu	Gly

H	Gly	Ala	Glu	Ala	Leu	Glu	Arg	Met	Phe	Leu	Ser	Phe	Pro	Thr	Thr	Lys	Thr	Tyr	Phe	Pro	His	Phe	Asp	Leu
S	Gly	Ala	Glu	Ala	Leu	Glu	Arg	Met	Phe	Leu	Gly	Phe	Pro	Thr	Thr	Lys	Thr	Tyr	Phe	Pro	His	Phe	Asp	Leu

H	Ser	His	Gly	Ser	Ala	Glu	Val	Lys	Gly	His	Gly	Lys	Lys	Val	Ala	Asp	Ala	Leu	Thr	Asp	Ala	Val	Ala	His
S	Ser	His	Gly	Ser	Asp	Glu	Val	Lys	Gly	His	Gly	Lys	Lys	Val	Ala	Asp	Ala	Leu	Thr	Lys	Ala	Val	Gly	His

H	Val	Asp	Asp	Met	Pro	Asp	Ala	Leu	Ser	Ala	Leu	Ser	Asp	Leu	His	Ala	His	Lys	Leu	Arg	Val	Asp	Pro	Val
S	Leu	Asp	Asp	Leu	Pro	Gly	Ala	Leu	Ser	Ala	Leu	Ser	Asp	Leu	His	Ala	His	Lys	Leu	Arg	Val	Asp	Pro	Val

H	Asp	Phe	Lys	Leu	Leu	Ser	His	Cys	Leu	Leu	Val	Thr	Leu	Ala	Ala	His	Leu	Pro	Ala	Glu	Phe	Thr	Pro	Ala
S	Asp	Phe	Lys	Leu	Leu	Ser	His	Cys	Leu	Leu	Val	Thr	Asp	Glu	Ala	His	Ala	Pro	Asp	Asp	Phe	Ser	Pro	Gly

H	Val	His	Ala	Ser	Leu	Asp	Lys	Phe	Leu	Ala	Ser	Val	Ser	Thr	Val	Leu	Thr	Ser	Lys	Tyr	Arg			
S	Val	His	Ala	Ser	Leu	Asp	Lys	Phe									Thr	Ser	Lys	Tyr	Arg			

Tabelle 8: Partialformel der β -Kette des Schwein-Hämoglobins in Analogie zu Human-Hämoglobin

H	Val	His	Leu	Thr	Pro	Glu	Glu	Lys	Ser	Ala	Val	Thr	Ala	Leu	Try	Gly	Lys	Val	Asp	Val	Asp	Glu	Val	Gly
S	Val	His	Leu	Ser	Ala	Glu	Glu	Lys	Leu	Glu	Val	Gly	Ala	Leu	Try	Gly	Lys	Val	Asp	Val	Asp	Glu	Val	Gly

H	Gly	Glu	Ala	Leu	Gly	Arg	Leu	Leu	Val	Tyr	Pro	Try	Thr	Glu	Arg	Phe	Glu	Ser	Phe	Gly	Asp	Leu
S	Gly	Glu	Ala	Leu	Gly	Arg	Leu	Leu	Val	Tyr	Pro	Try	Thr	Glu	Arg	Phe	Glu	Ser	Phe	Gly	Asp	Leu

H	Ser	Thr	Pro	Asp	Ala	Val	Met	Gly	Asp	Pro	Lys	Val	Lys	Ala	His	Gly	Lys	Val	Leu	Gly	Ala	Phe	Ser
S	Ser	Ala	Pro	Asp	Ala	Val	Met	Gly	Asp	Asp	Lys	Val	Lys	Ala	His	Gly	Lys	Val	Leu	Gly	Ser	Phe	Ser

H	Asp	Gly	Leu	Ala	His	Leu	Asp	Asp	Leu	Lys	Gly	Thr	Phe	Ala	Thr	Leu	Ser	Glu	Leu	His	Cys	Asp	Lys	Leu
S	Asp	Glu	Leu	Lys	His	Leu	Asp	Asp	Leu	Lys	Gly	Thr	Phe	Ala	Lys	Leu	Ser	Glu	Leu	His	Cys	Asp	Glu	Leu

H	His	Val	Asp	Pro	Glu	Asp	Phe	Arg	Leu	Leu	Gly	Asp	Val	Leu	Val	Cys	Val	Leu	Ala	His	His	Phe	Gly	Lys	Glu
S	His	Val	Asp	Pro	Glu	Asp	Phe	Arg	Leu	Val	Gly	Asp	Val	Leu	Leu	Val	Val	Leu	Ala	Arg	Ara	Leu	Gly	His	Glu

H	Phe	Thr	Pro	Pro	Val	Glu	Ala	Ala	Tyr	Glu	Lys	Val	Val	Ala	Gly	Val	Ala	Asp	Ala	Leu	Ala	His	Lys	Tyr	His
S	Phe	Asp	Pro	Asp	Val	Asp	Ala	Ala	Phe	Glu	Lys	Val	Val	Ala	Gly	Val	Ala	Asp	Ala	Leu	Ala	His	Lys	Tyr	His

Experimenteller Teil

I. Die tryptischen Peptide der α -Kette des Schwein-Hämoglobins

αST_1 Pos. 1-7

Isolierung: Das N-terminale Peptid der α -Kette findet sich in den ersten neutralen Fraktionsgipfeln. Bei einem α -Kettenlauf, der stark mit β -Kettenmaterial verunreinigt war, befand sich das Peptid zusammen mit dem ditryptischen Arginyl-Lysyl-Peptid Pos. 117-132 der β -Kette im 5. Fraktionsgipfel. Die Trennung gelang mit phosphorylierter Cellulose. Die weitere Reinigung wurde über Dowex 50x2 und anschließend über Papierchromatographie durchgeführt. Eine befriedigende Analyse konnte auf diesem Weg jedoch nicht erhalten werden, da das zweite Heptapeptid der α -Kette Pos. 62-68 schlecht abzutrennen war. Ein weiterer Lauf der α -Kette mit besonders starker Spreizung der neutralen Fraktionen gestattete über Papierchromatographie die saubere Trennung und Analyse.

Rf = 0,31

Lys 0,97; Asp 1,00; Ser 0,99; Ala 2,00; Val 0,93; Leu 1,00;
Diese Werte ergeben einen Austausch des Prolins $\alpha 4$ bei Human-Hämoglobin gegen Alanin. Ähnliche Austausche dieses Prolins kommen auch beim Hämoglobin des Pferdes und Lamas vor. Ein drei-stufiger Edman-Abbau sicherte die Position des Peptides.

αST_2 Pos. 8-11

Isolierung: Das Tetrapeptid findet sich im ersten Fraktionsgipfel zusammen mit dem basischen Zentrum und freien Lysin. Die Reinigung erfolgte über phos. Cellulose und über Papier.

Rf = 0,20

Lys 0,97; Asp 0,97; Ala 0,94; Val 1,09;

Auch beim Lama-Hämoglobin wird in diesem Peptid ein Austausch von Thr gegen Ala gefunden.

αST_3 Pos. 12-16

Isolierung: Das Tryptophanpeptid erscheint im 4. Fraktionsgipfel des α -Kettenlaufes zusammen mit dem Dipeptid Tyr-Arg.

Die Trennung des Peptidgemisches gelang über phos. Cellulose.

Rf = 0,37

Lys 1,30; Gly 0,97; Ala 2,00; Try +;

Der Tryptophannachweis wurde mit einem spezifischen Sprühtest geführt.

α ST₄ Pos. 17-31

Isolierung: Das im 7. Fraktionsgipfel enthaltene Peptid wurde über phos. Cellulose rechromatographiert. Der zweite Gipfel dieser Rechromatographie zeigte noch ein Peptid der β -Kette, das über Papier abgetrennt werden konnte.

Rf = 0,22

His 1,11; Arg 0,91; Glu 2,95; Gly 3,97; Ala 3,83; Val 1,07; Leu 1,11;

Diese Werte sind nach 40-std. Hydrolyse gewonnen worden. Das Tyrosin des Human-Hämoglobins fehlt hier.

α ST₅ Pos. 32-40

Isolierung: Dieses Peptid ist das einzige des 3. Fraktionsgipfels des α -Kettenlaufs, so daß die Vermessung ohne Rechromatographie gelang.

Rf = 0,78

Lys 1,03; Thr 1,97; Pro 1,08; Gly 1,27; Met 0,67; Leu 1,09; Phe 1,86;

Wie bei der α -Kette des Pferdes und des Lamas ist hier das Threonin des Human-Hämoglobins gegen ein Glycin ausgetauscht.

α ST₆ Pos. 41-56

Isolierung: Das im 6. Fraktionsgipfel befindliche Peptid des α -Kettenlaufes mußte von drei weiteren Peptiden in diesem Gipfel abgetrennt werden. Die erste Rechromatographie erfolgte über phos. Cellulose, wo es im zweiten Gipfel gefunden wurde. Hieraus konnte es über Papier in analytisch reiner Form isoliert werden. Eine Rechromatographie über Dowex 50x2 führte ebenfalls zur Trennung.

Rf = 0,86

Lys 1,01; His 2,06; Asp 2,04; Thr 0,94; Ser 2,05; Glu 0,99; Pro 1,11; Gly 0,98; Val 0,94; Leu 0,97; Tyr 0,94; Phe 2,02; Eine 40-std. Hydrolyse ergab diese Werte. Gegenüber Human-Hämoglobin ist nur ein Ala gegen ein Asp ausgetauscht.

α ST₇ Pos. 57-60

Isolierung: Das Tetrapeptid, das sog. basische Zentrum ist im ersten Fraktionsgipfel enthalten. Die Rechromatographie erfolgte über phos. Cellulose, wo es im zweiten Gipfel eluiert wurde. Der zweimalige Edman-Abbau bestätigte die Sequenzkonstanz dieses Peptides in vielen anderen Hämoglobinen.

Rf = 0,04

Lys 1,08; His 0,99; Gly 1,92;

α ST₈ Pos. 61

Isolierung: Freies Lysin fand sich im ersten Gipfel des Gesamtkettenlaufes. Die Rechromatographie dieser Fraktion über phos. Cellulose zeigte Lysin im letzten Gipfel neben freiem Arginin und dem "basischen Zentrum" der α -Kette. Die weitere Trennung erfolgte über Papier.

Rf = 0,15

α ST_{9a} Pos. 62-68

Isolierung: Das beim Schwein, Lama und Kaninchen neu auftretende tryptische Peptid wurde aus dem ersten neutralen Fraktionsgipfel gewonnen. Die Abtrennung vom N-terminalen Peptid der α -Kette kann nur mit der Papierchromatographie durchgeführt werden. Die Identifizierung und Zuordnung ist bereits im allgemeinen Teil ausführlich besprochen worden.

Rf = 0,49

Lys 1,07; Asp 0,79; Thr 0,95; Ala 2,01; Val 1,04; Leu 1,00;

α ST_{9b} Pos. 69-90

Isolierung: Das Peptid wurde aus dem 7. Fraktionsgipfel des α -Kettenlaufes isoliert. Anschließend Rechromatographie über phos. Cellulose läßt es im 3. Fraktionsgipfel erscheinen. Weitere Reinigung erfolgte über Dowex 50x2.

Rf = 0,19

Lys 1,04; His 2,96; Asp 3,06; Ser 1,87; Pro 1,12; Gly 2,07;
Ala 3,93; Val 1,10; Leu 5,08;

Diese Analysenwerte wurden nach 70-std. Hydrolyse erhalten.
Dieses zweite Teilpeptid des 29-Peptides bei Human-Hämoglobin
zeigt beim Schwein-Hämoglobin mindestens 6 Austausche. Auf-
fällig ist das Fehlen von Methionin, welches ebenfalls beim
Lama-, Kaninchen-, Pferd- und Karpfen-Hämoglobin nicht vor-
handen ist.

α ST₁₀ Pos. 91-92

Isolierung: Das Dipeptid Leu-Arg fand sich im 3. Fraktions-
gipfel des Gesamtlaufes. In der anschließenden Rechromato-
graphie über phos. Cellulose war es als letztes Peptid zu
eluieren.

Rf = 0,52

Durch Vermessung des Peptides wurde das Molverhältnis Leu:Arg
1:1 ermittelt.

α ST₁₁ Pos. 93-99

Isolierung: Das dritte Heptapeptid der α -Kette war nur aus
dem zweiten neutralen Fraktionsgipfel des besonderen α -Ketten-
laufes mit starker Spreizung der neutralen Fraktionen zu ge-
winnen. Die Isolierung erfolgte in der Endstufe über Papier.

Rf = 0,41

Lys 0,98; Asp 1,96; Pro 1,03; Val 1,99; Phe 1,01;

α ST₁₂ Pos. 100-128

Isolierung: Über die Isolierung des 28-Peptides aus dem α -
"Core" wurde bereits im allgemeinen Teil ausführlich berich-
tet. Durch Interpolation einer 20-std. und einer 60-std. Hy-
drolyse ergeben sich folgende Analysenwerte:

Lys 1,03; His 3,18; Asp 3,59; Thr 1,04; Ser 2,91; Glu 0,73;
Pro 1,90; Gly 1,08; Ala 3,10; Cys 0,94; Val 2,26; Leu 5,08;
Tyr 1,09;

Rf = 0,11

Das Peptid zeigt gegenüber Human-Hämoglobin mindestens 7 Aus-
tausche. Zum Teil konnten die Positionen einzelner Austausche

durch Überlappung aus dem chymotryptischen α - "Core" festgelegt werden.

α ST₁₄ Pos. 140-141

Isolierung: Das C-terminale Dipeptid der α -Kette erscheint im 4. Fraktionsgipfel des α -Kettenlaufes. Bei der Rechromatographie dieser Fraktion läßt sich das Peptid rein aus dem letzten Gipfel des phos. Cellulose-Laufes gewinnen.

Rf = 0,42

Arg 0,89; Tyr 0,78;

II. Die tryptischen Peptide der β -Kette des Schwein-Hämoglobins

β ST₁ Pos. 1-8

Isolierung: Das N-termianle Peptid der β -Kette wurde aus der 16. Fraktion des Gesamtlaufes isoliert. In derselben Fraktion befand sich auch das lösliche Cys-Peptid der β -Kette, das durch eine Dowex 50x2-Chromatographie abgetrennt werden konnte.

Rf = 0,30

Lys 0,92; His 1,12; Ser 1,02; Glu 1,83; Ala 1,10; Val 0,94; Leu 1,04;

Durch einen Edman-Abbau wurde Valin als N-ständige Aminosäure bestimmt. In diesem Peptid finden sich gegenüber Human-Hämoglobin zwei Austausche: es fehlt wie beim Pferd-, Lama-, Kaninchen- und Esel-Hämoglobin das Prolin; weiterhin ist Threonin gegen Serin ausgetauscht.

β ST₂ Pos. 1-17

Isolierung: Das zweite tryptische Peptid der β -Kette Pos. 9-17 konnte nur als Teil eines ditryptischen Peptides Pos. 1-17 aus dem 15. Fraktionsgipfel des β -Kettenlaufes gefunden werden. Das Peptid zeigte nur mit dem Tryptophan-Sprühtest eine deutliche Anfärbung auf dem Papierchromatogramm. Die Reinigung erfolgte über phos. Cellulose.

Rf = 0,29

Lys 2,00; His 1,00; Ser 0,93; Glu 2,96; Gly 2,06; Ala 1,94;
Val 1,58; Leu 3,07; Try +;

Das Tryptophan dieses Peptides ist mittels Sprühtestes nachgewiesen. Im Bereich Pos. 9-17 kommen drei weitere Austausche hinzu.

BST₃ Pos. 18-30

Isolierung: Das Arginylpeptid konnte aus dem 17. Fraktionsgipfel des Gesamtlaufes isoliert werden, worin es als einziges vorgefunden wurde. Die Rechromatographie erfolgte über Dowex 50x2.

Rf = 0,4

Arg 1,08; Asp 2,16; Glu 1,89; Gly 2,89; Ala 1,06; Val 2,74;
Leu 1,06;

In diesem Peptid findet sich kein Austausch.

BST₄ Pos. 31-40

Isolierung: Im eindimensionalen Papierchromatogramm von ungespaltenen nicht oxydierten β -"Core" zeigte sich ein Try- und Arg-positives Peptid mit hohem Rf-Wert. Die Trennung von β - "Core" gelang über phos. Cellulose, von der es nach 20 Fraktionen eluiert werden konnte, während das β - "Core" erst mit 20% Pyridin als Gradient erschien.

Rf = 1,35

Arg 0,85; Thr 0,97; Glu 1,30; Pro 1,00; Val 1,59; Leu 2,21;
Tyr 0,96; Try +;

Das Peptid enthält keinen Austausch.

BST₅ Pos. 41-59

Isolierung: Das Methioninpeptid findet sich im letzten (18.) Fraktionsgipfel des Gesamtlaufes. Bei der Rechromatographie über Dowex 50x2 erschien das Peptid in mehreren Gipfeln; der Grund ist die teilweise Oxydation des Methioninrestes zu Methioninsulfoxyd.

Rf = 0,45

Lys 1,11; Asp 3,90; Ser 1,95; Glu 1,02; Pro 1,09; Gly 1,97;
Ala 1,97; Val 1,13; Met 0,62; Leu 1,05; Phe 2,87;

In diesem Peptid sind gegenüber Human-Hämoglobin zwei Austausch zu verzeichnen: Pro-Asp; Thr-Ala.

β ST₆ Pos. 60-61

Isolierung: Das Dipeptid konnte auf Grund des Rf-Wertes und der charakteristischen Eluierung im 3. Fraktionsgipfel erkannt werden. Eine Isolierung mißlang.

Rf = 0,30

Val-Lys;

β ST₇ Pos. 62-65

Isolierung: Das aus dem 2. Fraktionsgipfel des β -Kettenlaufes gewonnene Peptid konnte erfolgreich über phos. Cellulose rechromatographiert werden. Der Edman-Abbau ergab N-ständiges Alanin.

Rf 0,04

Lys 1,07; His 1,13; Gly 0,88; Ala 0,90;

Das sog. basische Zentrum zeigt in allen bisher untersuchten Hämoglobinen der Säuger konstante Zusammensetzung.

β ST₈ Pos. 66

Isolierung: Die Rechromatographie des ersten Fraktionsgipfels des β -Kettenlaufes über phos. Cellulose ergab im zweiten Gipfel freies Lysin.

Rf = 0,12

β ST_{9a} Pos. 67-76

Isolierung: Das Peptid findet sich im 11. Fraktionsgipfel des Gesamtlaufes und im 7. Gipfel des β -Kettenlaufes. Die Vermessung erfolgte nach Rechromatographie über Dowex 50x2.

Rf = 0,29

Lys 1,09; Asp 1,02; Ser 1,83; Glu 1,01; Gly 1,02; Val 1,07;
Leu 1,97; Phe 0,97;

BST_{9b} Pos. 77-82

Isolierung: Ebenfalls im 11. Fraktionsgipfel des Gesamtlaufes erschien dieses Peptid. Dieselbe Rechromatographie über Dowex 50x2 wie bei BST_{9a} ermöglichte die Isolierung.

Rf = 0,32

Lys 0,89; His 1,12; Asp 2,10; Leu 1,94;

Das BHT₉ des Human-Hämoglobins zerfällt beim Schwein-Hämoglobin in zwei tryptische Peptide durch einen Austausch von Ala 76 gegen Lys. Über die Festlegung der Position dieser neuen Teilpeptide wurde im allgemeinen Teil berichtet. In den Bereich des BHT₉ fallen beim Schwein-Hämoglobin mindestens 3 Austausche.

BST₁₀ Pos. 83-87

Isolierung: Der 2. Fraktionsgipfel des β -Kettenlaufes enthält neben dem bas. Zentrum dieses Peptid. Die Rechromatographie wurde mit phos. Cellulose durchgeführt.

Rf = 0,31

Lys 1,00; Thr 1,04; Gly 0,93; Ala 1,00; Phe 0,89;

Dieses Pentapeptid ist ein im Schwein-Hämoglobin und Lama-Hämoglobin neu auftretendes Lysyl-Peptid, das einen Teil des BHT₁₀ darstellt.

BST₁₁ Pos. 88-104

Isolierung: Im 16. Fraktionsgipfel des Gesamtlaufes und im 14. des β -Kettenlaufes ist ein Cystein-Arginin-Peptid festzustellen, das am Startpunkt des eindimensionalen Papierchromatogramms sitzen bleibt. Nach Oxydation der Fraktion mit Perameisensäure wurde eine Rechromatographie mit Dowex 50x2 angeschlossen.

Rf = 0

His 1,96; Arg 0,82; Asp 2,92; Ser 1,00; Glu 2,88; Pro 1,10; Cys 0,86; Leu 3,02; Phe 0,97;

Durch den Austausch des Lys 895 beim Schwein-Hämoglobin entsteht ein gegenüber Human-Hämoglobin neues tryptisches Arginylpeptid, das auf Grund einer neu erworbenen Löslichkeit im löslichen tryptischen Hydrolysat zu finden ist.

BST_{12a} Pos. 105-116

Isolierung: Dieses Peptid kann nicht aus dem löslichen tryptischen Hydrolysat isoliert werden. Die Rekonstruktion des Peptides gelingt nur aus seinen peptischen Spaltprodukten aus dem β -"Core".

BST_{12b} Pos. 117

Isolierung: Freies Arginin erscheint im ersten Fraktionsgipfel des β -Kettenlaufes. Die Rechromatographie dieser Fraktion über phos. Cellulose läßt es aus dem 3. Gipfel gewinnen.

Rf = 0,14

Die Vermessung des Hydrolysates ergab eindeutig Arginin, wobei molmäßig Poly-Arginin ausgeschlossen werden konnte.

BST₁₃ Pos. 118-127

Isolierung: Das Lysyl-Peptid läßt sich aus dem 9. Fraktionsgipfel des β -Kettenlaufes gewinnen, ein homologes ditryptisches Arginyl-Lysyl-Peptid aus dem 5. Fraktionsgipfel des gleichen Laufes. Rechromatographiert wurden beide über phos. Cellulose.

Rf = 0,2

Lys 0,96; His 0,97; Asp 2,98; Glu 2,00; Pro 1,07; Gly 1,04; Ala 2,00; Val 1,01; Leu 1,02; Phe 1,87;

Über die Einordnung dieses Peptides wurde bereits im allgemeinen Teil berichtet.

BST₁₄ Pos. 133-144

Isolierung: Bei der modifizierten Dowex lx2-Chromatographie - mit starker Basenkonzentration - erscheint im Gegensatz zu Versuchen bei Human-Hämoglobin, wo es erst im 4. Fraktionsgipfel zu finden ist, dieses Peptid schon im ersten Gipfel, obwohl die Summenformeln der Peptide aus Human- und Schwein-Hämoglobin gleich sind. Die Rechromatographie erfolgte über phos. Cellulose, aus der es als erstes Peptid eluiert wurde. Eine 40-std. Hydrolyse ergab folgende Werte:

Lys 1,13; His 1,09; Asp 1,03; Gly 1,06; Ala 4,00; Val 2,59; Leu 1,08;

Rf = 0,33

ST₁₅ Pos. 145-146

Isolierung: Im 11. Fraktionsgipfel des β -Kettenlaufes war das C-terminale Dipeptid zu finden. Es wurde über phos. Cellulose gereinigt. Das eindimensionale Papierchromatogramm des Hydrolysates zeigte Tyrosin und Histidin im Verhältnis 1:1.

III. Chymotryptische Peptide des α -''Core'' des Schwein-Hämoglobins

Es werden die Ergebnisse aus zwei gesonderten chymotryptischen Spaltungen und Läufen angeführt.

SCh 91-98

Isolierung: Aus dem 4. Fraktionsgipfel des 2. Laufes wurde dieses Peptid zuerst über phos. Cellulose aus dem ersten Gipfel rechromatographiert und dann über Papier gereinigt.

Rf = 0,95

Arg 0,95; Asp 2,03; Pro 1,15; Val 1,79; Leu 1,03; Phe 1,03;

SCh 99-101

Isolierung: Dieses Tripeptid konnte ebenfalls aus dem 2. Lauf im ersten Fraktionsgipfel gefunden werden. Die Rechromatographie erfolgte über phos. Cellulose, welche aber keine Trennung von einem weiteren Peptid brachte. Deshalb wurden beide Peptide über Papier zur analytischen Reinheit gebracht.

Rf = 0,93

Lys 1,03; Leu 1,96;

SCh 102-106

Isolierung: Das Cystein-Pentapeptid findet sich im letzten Fraktionsgipfel des 1. Laufes. Das N-ständige Serin gibt einen charakteristischen gelben Farbton mit Ninhydrin. Der Fraktionsgipfel wurde über Dowex 50x2 rechromatographiert; das Cys-Pep-

tid aus dem ersten Gipfel konnte anschließend vermessen werden.

Rf = 0,61

His +; Cys +; Ser 0,86; Leu 1,83;

Wegen der geringen Menge des Peptides wurden nur die neutralen Aminosäuren vermessen, Histidin und Cystein papierchromatographisch nachgewiesen.

SCh 111-117

Isolierung: Dieses Peptid konnte aus demselben Fraktionsgipfel und in demselben Arbeitsgang wie beim Peptid SCh 102-106 gewonnen werden.

Rf = 0,08

His 1,05; Asp 1,91; Pro 1,04; Ala 1,90; Phe 0,99;

Im Bereich dieses Peptides sind mindestens 3 Austausch gegenüber Human-Hämoglobin festzustellen.

SCh 112-128

Isolierung: Das Peptid findet sich im 6. Fraktionsgipfel des 2. chymotryptischen Laufes. Die Rechromatographie gelang mit Dowex 50x2. Es war noch eine Reinigung über Papier erforderlich.

Rf = 0,03

Lys 0,95; His 2,05; Asp 2,84; Ser 2,16; Pro 1,16; Gly 0,87;

Ala 2,16; Val 0,88; Leu 0,88; Phe 1,58;

SCh 123-127

Isolierung: Dieses Peptid wurde aus dem 2. Fraktionsgipfel des 1. chym. Laufes isoliert. Dieser Gipfel enthielt mindestens 7 weitere Peptide. Die Rechromatographie über phos. Cellulose ergab nur eine mäßige Trennung, so daß der 4. Gipfel der Rechromatographie neben dem genannten Peptid noch zwei weitere enthielt. Über Papier konnte das Peptid endgültig isoliert werden.

Rf = 0,18

Lys 1,14; Asp 1,25; Ser 1,01; Ala 0,87; Leu 0,98;

Im Bereich dieses Peptides ist kein Austausch gegenüber Human-Hämoglobin.

SCh 123-128

Isolierung: Das Peptid wurde aus dem 3. Fraktionsgipfel des 2. Laufes gewonnen. Reinigung und Vermessung gelang nach Rechromatographie über phos. Cellulose.

Rf = 0,66

Lys 1,14; Asp 1,02; Ala 0,94; Leu 1,03; Phe 0,85;

Das Peptid zeigt Überlappung mit Bereichen der letzten zwei aufgeführten Spaltprodukte und bestätigt damit deren Positionen.

SCh 137-139

Isolierung: Das Peptid wurde wie Peptid SCh 99-101 aus dem ersten Fraktionsgipfel des 2. chym. Laufes über phos. Cellulose und Papierchromatographie isoliert.

Rf = 0,12

Lys 1,04; Thr 0,93; Ser 1,14;

IV. Die peptischen Peptide des β -"Core" des Schwein-Hämoglobins

SP 88-96

Isolierung: Dieses Cystein-Peptid wurde aus dem 6. Fraktionsgipfel gewonnen. Die Reinigung erfolgte über Papierchromatographie.

Rf = 0,37

His 1,04; Cys 0,78; Asp 1,02; Ser 0,98; Glu 2,21; Leu 2,87;

In diesem Peptid findet sich der Austausch Lys-Glu.

SP 97-102

Isolierung: Das im letzten Fraktionsgipfel des peptischen Laufes enthaltene Prolylpeptid wurde über Papier gereinigt.

Rf = 0,15

His 0,81; Asp 2,03; Glu 1,14; Pro 1,45; Val 1,01;

SP 105-114

Isolierung: Aus dem 3. Fraktionsgipfel und nach Reinigung über Papier konnte dieses Peptid vermessen werden. Die Valin- und Leucin-Werte sind nach 100-std. Hydrolyse angegeben.

Rf = 1,36

Asp 0,69; Gly 0,72; Val 4,22; I-Leu 0,94; Leu 2,83;

Über die sequenzanalytischen Arbeiten wurde bereits im allgemeinen Teil berichtet.

SP 112-117

Isolierung: Dieses Arginyl-Peptid fand sich im zweiten Fraktionsgipfel des peptischen Laufes neben freiem Arginin. Die Trennung gelang über Papier. Eine 40-std. Hydrolyse ergab folgende Werte:

Arg 0,95; Ala 1,03; Val 1,89; Leu 1,11;

Über den Edman-Abbau wurde im allgemeinen Teil berichtet.

SP 115-117

Isolierung: Im ersten Fraktionsgipfel fand sich dieses Tripeptid. Es wurde über Papier gereinigt.

Rf = 0,29

Arg 2,03; Ala 0,97;

SP 116-128

Isolierung: Das im 3. Fraktionsgipfel enthaltene Peptid wurde über Papier gereinigt.

Rf = 0,07

His 1,01; Arg 2,06; Asp 2,65; Glu 1,02; Pro 0,91; Gly 1,14;

Ala 1,16; Val 1,01; Leu 1,04; Phe 0,96;

V. Einige lösliche tryptische Peptide des Esel-Hämoglobins

α -Kette

α ET₂ Pos. 8-11

Isolierung: 4. Fraktionsgipfel

Die Rechromatographie erfolgte über phos. Cellulose, wo sich das Peptid rein in der zweiten Fraktion fand.

Rf = 0,15

Lys 1,10; Asp 0,99; Ser 0,96; Val 0,92;

Das Threonin bei Human-Hämoglobin ist hier gegen Serin ausgetauscht.

α ET₃ Pos. 12-16

Isolierung: 5. Fraktionsgipfel

Die Rechromatographie mit phos. Cellulose ließ das Peptid im 4. Fraktionsgipfel finden.

Rf = 0,37

Lys 1,10; Gly 0,98; Ala 1,83; Try +;

Das Tryptophan wurde im Sprühtest nachgewiesen.

α ET₄ Pos. 17-31

Isolierung: 17. Fraktionsgipfel

Das Peptid wurde über Papier gereinigt.

Rf = 0,25

Arg 0,95; His 0,92; Glu 3,03; Gly 3,99; Ala 3,00; Val 1,02;

Leu 1,03; Tyr 0,72;

Das Alanin bei Human-Hämoglobin ist hier gegen Glycin ausgetauscht.

α ET₅ Pos. 32-40

Isolierung: 5. Fraktionsgipfel

Bei der Rechromatographie über phos. Cellulose fand sich das Peptid im ersten Fraktionsgipfel.

Rf = 0,86

Lys 1,00; Thr 1,96; Ser 0,91; Pro 1,05; Met 0,35; Leu 0,99;

Phe 1,85;

α ET₆ Pos. 41-56

Isolierung: 9. Fraktionsgipfel

Über phos. Cellulose wurde das Peptid gereinigt.

Rf = 0,09

Lys 0,97; His 1,91; Asp 0,97; Thr 1,00; Ser 2,00; Glu 0,97;
Pro 1,00; Gly 1,02; Ala 1,02; Val 1,08; Leu 1,00; Tyr 0,93;
Phe 1,99;

α ET₇ Pos. 57-60

Isolierung: 4. Fraktionsgipfel

In der Rechromatographie über phos. Cellulose wurde das
Peptid als letztes (4.) eluiert.

Rf = 0,04

Lys 1,00; His 1,10; Gly 1,79;

α ET₈ Pos. 61

Isolierung: 4. Fraktionsgipfel

Das Peptid fand sich in der Rechromatographie mit phos.
Cellulose im ersten Fraktionsgipfel; zur analytischen Rein-
heit war noch eine Reinigung über Papier erforderlich.

Rf = 0,15

Freies Lysin wurde nach Totalhydrolyse papierchromatogra-
phisch erkannt.

α ET₁₄ Pos. 140-141

Isolierung: 6. Fraktionsgipfel

Die phos. Cellulose-Rechromatographie ließ das Peptid im
letzten Fraktionsgipfel eluieren.

Rf = 0,42

Arg 1,00; Tyr 0,91;

B-Kette

BET₁ Pos. 1-8

Isolierung: 14. Fraktionsgipfel

Die Rechromatographie erfolgte über phos. Cellulose, wo sich das Peptid im 6. Gipfel befand.

Rf = 0,61

Lys 1,00; Asp 0,90; Thr 1,79; Gly 0,88; Ala 1,11; Val 1,15;
Leu 1,12;

In diesem Peptid sind gegenüber Human-Hämoglobin minimal 3 Austausche.

BET₃ Pos. 18-30

Isolierung: 18. Fraktionsgipfel (letzter)

Die primäre Reinheit des Peptides erforderte keine Rechromatographie.

Rf = 0,4

Arg 0,89; Asp 1,90; Glu 1,98; Gly 3,06; Ala 1,08; Val 3,00;
Leu 0,99;

BET₆ Pos. 60-61

Isolierung: 5. Fraktionsgipfel

Das Peptid wurde über phos. Cellulose rechromatographiert.

Rf = 0,3

Lys 1,09; Val 0,90;

BET₇ Pos. 62-65

Isolierung: 4. Fraktionsgipfel

Bei der Rechromatographie über phos. Cellulose fand sich das Peptid im 3. Gipfel.

Rf = 0,04

Lys 1,10; His 1,20; Gly 1,00; Ala 0,92;

BET₈ Pos. 66

Isolierung und Rechromatographie wie ET 8.

BET₉ Pos. 67-82

Isolierung: 14. Fraktionsgipfel

Das Peptid wurde über Papier gereinigt.

Rf = 0,43

Lys 0,94; His 0,90; Asp 3,82; Gly 2,18; Ala 1,15; Val 1,09;
Leu 3,90; Phe 1,01;

In diesem Peptid befindet sich ein Austausch Alanin gegen
Asparaginsäure gegenüber Human-Hämoglobin.

BET₁₃ Pos. 121-132

Isolierung: 7. Fraktionsgipfel

Die Rechromatographie über phos. Cellulose ergab das Peptid
im 1. Fraktionsgipfel.

Rf = 0,16

Lys 1,00; Thr 1,02; Glu 3,84; Pro 0,93; Ala 2,06; Val 1,22;
Tyr 0,54; Phe 1,04;

Dieses Peptid zeigt einen Austausch von Prolin gegen Glutamin-
säure im Vergleich mit Human-Hämoglobin.

BET₁₄ Pos. 133-143

Isolierung: 4. Fraktionsgipfel

Bei der Rechromatographie über phos. Cellulose wurde das Pep-
tid im ersten Fraktionsgipfel gefunden; anschließend mußte
es noch über Papier gereinigt werden.

Rf = 0,25

Lys 1,00; His 0,95; Asp 1,07; Gly 1,36; Ala 3,99; Val 2,87;
Leu 1,00;

Diese Werte wurden nach 40-std. Hydrolyse erhalten.

α ET₁₅ Pos. 145-146

Isolierung: 12. Fraktionsgipfel

Die Rechromatographie wurde über Dowex 50x2 durchgeführt und
ließ das Peptid aus dem ersten Fraktionsgipfel isolieren.

Rf = 0,33

Die Aminosäuren Tyr und His im Verhältnis 1:1 konnten im
Papierchromatogramm erkannt werden.

VI. Die Methoden

1. Reinigungs- und Isolierungs-Methoden

a) Blutgewinnung

Das Frischblut wurde teils durch Ausbluten getöteter Tiere, teils durch Venenpunktion lebender Tiere gewonnen. Die Gerinnung konnte durch Citratzusatz oder Heparinisierung verhindert werden. Das Mischungsverhältnis von isotonischer Citratlösung (3,8%) und Blut betrug 1:5. Der stabile CO-Komplex wurde durch Einleiten von Leuchtgas dargestellt.

b) Hämoglobingewinnung

Das ungerinnbar gemachte Blut wurde 5x je 10 Min. bei 3000 U/Min. zentrifugiert, der Überstand abgesaugt und das Erythrozytensediment mit physiologischer Kochsalzlösung mehrmals gewaschen. Die Hämolyse der Erythrozyten erfolgte durch Erniedrigung des osmotischen Druckes: 1 Vol. Erythrozyten-Lösung + 1 Vol. H_2O + 0,4 Vol. Toluol. Diese Lösung wurde bei +2 Grad 14 Stunden stehengelassen. Durch zweimaliges Zentrifugieren bei 1500 U/Min. können die Zellmembrantrümmer abgetrennt werden. Die Hämoglobinkonzentration der Lösung wird durch Messung der Absorption bei 415 m nach folgender Formel bestimmt: $E \times 0,12 \times \text{Verdünnung} = \text{mg Hb/ml}$.

c) Analytische Trennung der Hämoglobinkomponenten.

Die qualitative Trennung erfolgte mittels Stärkegel-Elektrophorese. Käufliche Kartoffelstärke wurde partiell durch Inkubation bei +40 Grad 2-3 Stunden lang in 1% HCl-Aceton-Lösung hydrolysiert. Anschließend wurde die Stärke mehrmals abwechselnd mit H_2O und Aceton gewaschen und filtriert.

Das Stärkegel wurde durch Erhitzen im Wasserbad als 10-15% Stärke-Pufferlösung hergestellt. Als Elektrophorese-Puffer wurden ein 0,06n Na-Veronalpuffer pH 8,6 und 0,1n Citrat-Puffer pH 5,25 verwendet.

Die Spannung betrug bei 14-18 stündiger Laufzeit 80 bis 150 Volt.

Eine präparative Trennung der Hämoglobinkomponenten wurde auf einer Carboxymethyl-Cellulose-Säule versucht. Voraus-
ging die Oxydation des Hämoglobins zu Methämoglobin, welche
mit rotem Blutlaugensalz in 20% Oxydationsäquivalent-Über-
schuß durchgeführt wurde. Die Bedingungen der Oxydation
waren: pH 6,8; Zeit 60 Minuten; Temperatur +4 Grad. An-
schließend folgte eine Dialyse gegen den Äquilibratorungs-
puffer des Austauschers. Die CM-Cellulose-Säule wurde mit
0,01n Na-Phosphat pH 7,2 äquilibriert. Die Hämoglobin-Lö-
sung wurde bei pH 7,2 aufgetragen. Mit dieser Elutions-
flüssigkeit konnte die sog. schnelle Komponente eluiert
werden, während die sog. langsamen Komponenten Gradienten
von 0,4-0,6 Na-Phosphat zur Elution benötigten.

d) Trennung der Polypeptidketten

Eine qualitative Trennung der Untereinheiten konnte mittels
Stärkegel-Elektrophorese in einem 1,4n Na-Formiatpuffer
pH 1,8 erreicht werden.

Für die präparative Trennung erwies sich die Gegenstromver-
teilung brauchbar. Die optimale Dichloressigsäure-Konzentra-
tion von 1% bei Human-Hämoglobin konnte für das Schwein-Hämo-
globin beibehalten werden. Das binäre System umfaßte als Un-
terphase 25ml sek. Butanol-gesättigte 1% DCA-Lösung und als
Oberphase 25 ml mit 1% DCA gesättigtes sek. Butanol. Zur Un-
terphase kam noch 0,001% Thiodiglykoll. Die anfänglichen
Trennungszeiten von mehreren Stunden konnten gegen Ende der
98-110 Verteilungsschritte auf 10 Minuten verkürzt werden.
Dieses System hatte bei guter Trennung eine maximale Kapazi-
tät von 15mg/ml. Damit lag die Grenze der eingesetzten Glo-
binmenge bei 1,5 g. Diese wurden in 90 ml H₂O gelöst, dann
wurden 10 ml 2% DCA hinzugefügt und anschließend zweimal
gegen Unterphase dialysiert. Diese Lösung wurde mit Unter-
phase auf 200 ml aufgefüllt und die gleiche Menge Oberphase
hinzugefügt. Die erste Trennung erfolgte in einem Scheide-
trichter während 12 Stunden im äquilibrierten Milieu. Die
Mittelschicht wurde durch Zentrifugation getrennt oder bei

geringer Menge verworfen. Die Bestimmung der Eiweiß-haltigen Fraktionen geschah durch Messung bei 280 m μ , nachdem durch Zugabe von je 5 ml Äthanol auf ein Element die Phasentrennung aufgehoben wurde. Die Protein-positiven Elemente der α - und β -Ketten wurden zusammengefaßt und nach Neutralisation mit 4n Na-Acetat und Dialysierung gegen 1% Essigsäure mit dem Rotationsverdampfer eingengt. Das Kettenmaterial wurde lyophilisiert.

Die geringe Kapazität dieses Systems konnte mit der Modifikation nach Königsberg wesentlich erhöht werden. Es gelang so die Trennung von 5 g Globin in einem Versuch. Die Phasenzusammensetzung dieser Modifikation lautet:

Oberphase	9 Teile sek. Butanol
Unterphase	1 Teil 10% DCA + 10 Teile 0,5n HAC

e) Reduktion des Globins

Durch die Reduktion der SH-Gruppen des Globins konnte der Trenneffekt und die Ausbeute erhöht werden. Das Globin wurde in 10n Harnstofflösung mit konz. Ammoniak auf pH 8,0 gebracht. Die Temperatur der Reaktionszelle wurde auf +37 Grad erhöht. Durch Zugabe von Merkaptoäthanol wurde eine 1% Lösung hergestellt, welche unter Stickstoff-Atmosphäre 6 Stunden lang stehen gelassen wurde. Dabei erhöhte sich das pH auf 8,6. Mit Eisessig wurde anschließend auf pH 4,0 gebracht. Das saure pH muß beibehalten werden, da nur so die reduzierten SH-Gruppen beständig sind. Es folgten mehrere Dialysen gegen 2% Essigsäure und schließlich gegen Unterphase des Verteilungssystems.

f) Säulenchromatographien mit Dowex 1x2, 200-400 mesh

Dieser von Rudloff und Braunitzer (13) für die Chromatographie von tryptischen Hydrolysaten angewandte Austauscher wurde mit veränderten Versuchsbedingungen übernommen. Es wurden mit diesem Austauscher die löslichen und die unlöslichen, nachgespaltenen, tryptischen Peptide von getrenntem und ungetrenntem Kettenmaterial chromatographiert.

Für das lösliche trypt. Hydrolysat waren die Bedingungen folgende:

Säulenmaße: 1,8 x 80 cm. Mischgefäß: 900 ml; Temp.: 35 Grad;
Fraktionsvolumen: für die ersten 60 Fraktionen 5 ml, dann 10 ml.

Äquilibrierungspuffer: Acetatlösung mit 1,5% Pyridin, 1,5% 2,4-Lutidin, 1,5% α -Picolin, pH 8,4

Elutionsgeschwindigkeit: 30 ml/Stunde

Aufzutragendes Peptidgemisch in 20-30 ml 2% Pyridin gelöst, pH 9,5

I. Gradient: Acetat-Lösung mit 1,5% Collidin, 1,5% 2,4-Lutidin, 1,5% α -Picolin, 1,5% Pyridin, pH 7,9;
Mit diesem Gradienten wurde das Mischgefäß ausgewechselt.

II. Gradient: 0,15n Essigsäure an das Mischgefäß angeschlossen.

III. Gradient: 2n Essigsäure.

IV. Gradient: Eisessig.

Für chymotryptisch gespaltenes α -"Core" (450 mg) galten folgende Bedingungen:

Säulenmaße: 80 x 1,8 cm; Mischgefäß: 600 ml; Temp.: 35 Grad;
Fraktionsvolumen: 5 ml.

Äquilibrierungspuffer: Acetatlösung mit 1% Pyridin, 1% α -Picolin, 1% Lutidin, pH 7,8.

I. Gradient: 2% Pyr., 2% α -Pic., 2% Lut., pH 6,5.

II. Gradient: 3% Pyr., 3% α -Pic., 3% Lut., pH 5,8.

III. Gradient: 3% Pyr., 3% α -Pic., 3% Lut., pH 4,0.

Die letzten Fraktionen wurden mit Eisessig eluiert.

Für peptisch gespaltenes β -"Core" (150 mg) waren die Bedingungen folgende:

Säulenmaße: 60 x 1,0 cm; Mischgefäß: 150 ml; Temp.: +35 Grad;
Fraktionsvolumen: 5 ml; Äquilibrierung: 1,5% Pyr., 1,5% Lut.
1,5% α -Pic.-Acetat, pH 8,4.

I. Gradient: 6% Pyr., pH 6,0.

II. Gradient: 7,5%Pyr., 7,5% α -Pic., pH 4,0.

Abschließend Eisessig als Gradient.

g) Rechromatographien

Dowex 50x2; 200-400 mesh;

Dieser Austauscher eignet sich besonders für die Rechromatographie von sauren Peptiden, sowie von Cysteinsäure-Peptiden. Als Puffer können sowohl Formiat als auch Acetat-Lösungen angewandt werden, es können sogar beide Anionen während eines Laufes gewechselt werden.

Säulenmaße: 15 x 1,0 cm; Mischgefäß: 150-200 ml; Temp.: +50°;
Äquilibrierung: 5% Pyridin-Acetat (Formiat) pH 3,0.

I. Gradient: 15% Pyr.-Acetat, pH 4,5.

II. Gradient: 30% Pyr.-Acetat, pH 5,6.

III. Gradient: 30% Pyridin.

Diese Standardgradienten wurden oft je nach dem zu analysierenden Peptid variiert.

Phosphorylierte Cellulose

Mit diesem Kationenaustauscher konnten fast alle Peptide von tryptischen und "Core"-Läufen getrennt werden. Die Trennung blieb dann aus, wenn das Peptidgemisch zuviel Salz enthielt. In diesen Fällen wurden die Peptide ungetrennt mit der Front eluiert. Auch bei Cys-Peptiden erwies sich der Austauscher als ungeeignet, da diese nicht mehr von der Säule zu eluieren waren. Der bei diesem Austauscher mitwirkende Molekularsiebeffekt bewirkte, daß grundsätzlich von ladungsgleichen Peptiden die größeren zuerst eluiert werden.

Zwei Standard-Säulen-Systeme wurden angewandt:

1. Säulenmaße: Durchmesser 1-2 cm; Länge 10-30 cm.

Mischgefäß: 100-250 ml; Fraktionsvolumen: 5 ml;

Äquilibrierung: 0,1n Pyridin-Formiat pH 3,0

I. Gradient: 1n Pyr.-Form. pH 3,4 bis 40. Fraktion

II. Gradient: 1n Pyr.-Form. pH 3,7 bis 60. Fraktion

III. Gradient: 2n Pyr.-Form. pH 4,2 bis 80. Fraktion

IV. Gradient: 2,5n Pyr.-Form. pH 4,5 bis 120. Fraktion.

2. Säulenmaße: Durchmesser 0,7 cm; Länge 10-40 cm;

Mischgefäß: 50 ml; Fraktionsvolumen: 2-3 ml;

Äquilibrierung: 0,05n Pyr.-Formiat pH 2,8

- I. Gradient: 0,1n Pyr.-Form. pH 3,0 bis 30. Fraktion
- II. Gradient: 0,5n Pyr.-Form. pH 3,4 bis 60. Fraktion
- III. Gradient: 1n Pyr.-Form. pH 3,4 bis 80. Fraktion
- IV. Gradient: 2n Pyr.-Form. pH 4,2 bis 110. Fraktion

Sephadex G-25 und G-75

Mit diesem Austauscher wurden Versuche zur Reinigung von schwerlöslichen tryptischen Peptiden unternommen.

Säulenmaße: 200 x 0,7 cm; Temp.: +20°; Fraktionsvolumen: 2 ml;

Elutionsflüssigkeit: 20-50% Essigsäure;

Aufzutragendes Peptidgemisch: Maximal 4 ml;

Elutionsvolumen eines Laufes: 80 ml.

Papierrechromatographie

Es wurde nur das absteigende BEW-System angewandt:

n-Butanol/Eisessig/Wasser = 4:1:5; Laufzeit 20-50 Stunden;

Laufstrecke: 45 cm. Die Substanz wird in 10-15 Punkten zu je 0,1µmol aufgetragen auf Schleicher-Schüll-Papier 2043b. Zur Sichtbarmachung der Peptidbande wird streifenweise die Ninhydrinsprühreaktion mit 0,01% Ninhydrinlösung gemacht. Das peptidhaltige Papier wird herausgeschnitten und absteigend mit 5-30% Essigsäure eluiert.

Hochspannungselektrophorese

Die Trennung erfolgte auf Schleicher-Schüll-Papier 2043b in einem mit Pyridin gesättigten Toluol-Kühlbad. Als Puffer diente 5% Pyr.-Acetat pH 6,3. Die Spannungen betrugen zwischen 2500 und 4000 Volt bei 20-70 mA und Laufzeiten von 40-60 Minuten.

h) Sprühreaktionen

Zur qualitativen Ermittlung von Aminosäuren und Peptiden auf Papier wurde eine 0,1% Ninhydrinlösung verwendet. Das getrocknete Chromatogramm wurde besprüht und bei 110 Grad 3-5 Minuten entwickelt. Zum Nachweis eines Peptides, das präparativ getrennt werden sollte, konnte man sich auch einer 0,02% Nin-

hydrinlösung bedienen.

Spezifische Sprühteste auf Arginin, Tyrosin, Tryptophan und Histidin wurden nach Durrum, Block und Zweig ausgeführt (15).

1) Aufarbeitung der Fraktionen

Die Analyse der Fraktionen wurde mit Ninhydrin nach Stein und Moore (16) durchgeführt. Meist wurde ein aliquoter Teil von 0,1-0,3 ml vor der Ninhydrinreaktion alkalisch hydrolysiert, selten wurde die Ninhydrinreaktion direkt gemacht. Die positiven Fraktionen wurden zusammengefaßt und im Rotationsverdampfer eingeeengt. Anschließend wurden diese in 3 oder 5 ml H_2O gelöst und als sog. "Stammlösungen" tiefgekühlt aufbewahrt.

2. Spaltungs- und Sequenzierungs-Methoden

a) Denaturierung des Materials

Die Denaturierung von Kettenmaterial erfolgte bei +60 Grad 45 Min. lang in 8 molarer Harnstofflösung in einer Globinkonzentration von 10 mg/ml. Durch fünfmalige Dialyse gegen verdünnte Essigsäure wurde der Harnstoff entfernt.

Die Denaturierung von tryptischem löslichem und unlöslichem Spaltmaterial für eine nachfolgende Nachspaltung konnte entweder durch Hitze-Denaturierung oder Säure-Denaturierung erreicht werden. Bei der ersteren wurde die Peptidlösung 3 Minuten bei +85 Grad gehalten, die letztere war ein erwünschter Nebeneffekt der Oxydation mit Perameisensäure.

b) Tryptische Spaltung

Das lösliche, denaturierte Kettenmaterial wurde in einer Reaktionszelle, an die ein Magnetprüher angeschlossen ist, auf +37 Grad erwärmt. Das anfängliche pH von ungefähr 4,0 wurde langsam auf den isoelektrischen Punkt erhöht, wo das Globin feinflockig auszufallen beginnt. In diesem Augenblick gibt man einen Teil der Enzymmenge hinzu und stellt kurze Zeit später das Spaltungsoptimum von pH 8 oder 9 ein. Durch automatische Titration mit 1n NaOH wird dieses pH aufrechterhalten. Nach

zwei Stunden fügt man den Rest des Enzyms hinzu. Die optimale Spaltungsdauer beträgt 6-8 Stunden.

Eine Modifikation der tryptischen Spaltung beginnt bei einem pH von 10,5 und einer Temperatur von ungefähr +10 Grad. Man läßt das pH während der Spaltung auf 8 absinken, was meist nach einer Stunde der Fall ist, und erwärmt dann auf +37 Grad unter Zugabe der restlichen Trypsinmenge.

Als ausreichende Trypsinmenge ist 1/200 bis 1/100 der Substratmenge gefunden worden. Das Präparat stammt von C.F. Boehringer und Sohn, Mannheim. Zur Inaktivierung evtl. vorhandenen Chymotrypsins bzw. anderer Proteasen wurde das Präparat 16 Stunden mit n/16 HCl bei +37 Grad inkubiert.

c) Chymotryptische Spaltung

Die Bedingungen der chymotryptischen Spaltung waren die gleichen wie die der tryptischen Spaltung. Die Spaltungszeit war jedoch auf 2-4 Stunden reduziert.

d) Peptische Spaltung

Pepsin spaltet optimal bei pH 1,5-2. Die Enzymmenge beträgt 1/100 der Substratmenge. Die denaturierte Proteinlösung wurde auf 100 ml verdünnt und mit 1n HCl auf das erforderliche pH eingestellt. Das Pepsin wurde in 1/16n HCl-Lösung zugefügt. Die Spaltungsdauer betrug 2 Stunden bei +37 Grad. Eine pH-Regulierung erübrigte sich. Die Spaltung wurde durch Rotationsverdampfung gestoppt.

e) Quantitative Aminosäureanalysen

Die Aminosäureanalysen der Totalhydrolysate wurden im automatischen Aminosäureanalysator der Firma Beckman, Fullerton, Calif. und der Firma Bender u. Hobein, München, durchgeführt.

f) Oxydation mit Perameisensäure

Die Oxydation von SH- und S-S-Gruppen kann sowohl an Kettenmaterial als auch an Peptiden durchgeführt werden. Zur Bereitung der Perameisensäure wurden 9,5 ml konz. Ameisensäure (99%)

mit 0,5 ml 30% H_2O_2 vereinigt und 90 Minuten bei Zimmertemperatur stehen gelassen. Dann wurde die Lösung auf -3°C abgekühlt und mit dem ebenfalls abgekühlten, zur Trockene gebrachten Substrat vermischt. Die Reaktionszeit betrug 2 Stunden. Anschließend wurde die Lösung mit der 10-fachen Wassermenge verdünnt und vorsichtig mehrmals im Rotationsverdampfer nach erneuter Verdünnung zur Trockene gebracht.

g) Carboxypeptidase-Spaltung

Für ein μmol Peptid waren 100-150 γ Carboxypeptidase A einzusetzen. Das Substrat wurde auf pH 8 gebracht, das Enzym wurde in 10% Litiumchlorid-Lösung hinzugefügt. Zur Durchspaltung des Peptides $\text{SP}_{105-114}$ aus dem β -"Core" wurde 12 Stunden inkubiert bei 37°C . Die Spaltung konnte durch Ansäuern oder Rotationsverdampfen gestoppt werden.

h) Edman-Abbau nach Sjöquist (17)

Anlagerung: Die Peptidlösung wurde durch Rotationsverdampfen und im Hochvakuum getrocknet. Das getrocknete Material wurde anschließend in einem ml H_2O gelöst und ausreichend alkalisch gemacht. Dann wurde die gleiche Menge N-Methylmorpholin-Eisessig-Äthanol hinzugefügt (für 1. Schritt: 6,0 N-Methylmorpholin, 0,15 Eisessig, ad 50,0 Äthanol). Zu dieser Lösung wurden 0,1 ml Phenylsenföl hinzugefügt; die Lösung wurde gut geschüttelt und bei 37°C 2-3 Stunden in einem verschlossenen Kölbchen stehen gelassen. Nach Ansäuern mit einigen Tropfen Eisessig wurde die Lösung im Rotationsverdampfer zur Trockene gebracht. Hierauf wurde das Präparat in gleichen Teilen Wasser und Benzol gelöst und mehrmals mit Benzol extrahiert. Anschließend wurde wieder im Rotationsverdampfer und Hochvakuum getrocknet.

Cyclisierung: Zu dem gut getrockneten Material wurde 2 ml Trifluoressigsäure hinzugegeben und die Lösung verschlossen 1 Stunde bei $+25^\circ\text{C}$ stehen gelassen. Danach wurde das Material mehrmals rotationsverdampft und wieder gelöst.

Beim 2. Schritt und bei weiteren Schritten wurde das getrocknete Material in folgender Lösung gelöst: 6,0 N-Methylmorpholin, 0,15 Eisessig, 50,0 Äthanol, ad 100,0 Wasser.

Bei mehrschrittigem Edman-Abbau wurde zwischen 1. und 2. Schritt eine Säulenchromatographie zwischengeschaltet:

Austauscher: Dowex 50x2, 50-100 mesh;

Säulenmaße: 8 x 0,3 cm. Äquilibration: 3% Formiat-Acetat
pH 2,1;

Die Substanz wurde in 4 ml 1% Formiat gelöst und aufgetragen; dann folgten für die ersten 2 Fraktionen: je 4 ml 0,2n Acetat für die nächsten drei Fraktionen: je 4 ml 0,17 n Pyr.-Ac. pH 4,8 für die fünfte Fraktion: 4 ml 1,07n Pyr.-Ac. pH 4,8 für die nächsten 2-3 Fraktionen: je 4 ml 8,5n Pyr.-Ac. pH 4,8. Der aliquote Teil von 0,03 ml dieser Fraktionen wurde aufsteigend in kleinen Systemen papierchromatographiert.

Die Chromatographie in folgendem modifizierten Patridge-System benötigte nur einige Stunden: 800 ml n-Butanol + 200 ml H₂O + 200 ml Eisessig + 10 ml Pyridin.

Diskussion der Ergebnisse

I. Vergleichende Betrachtung der Primärstrukturen von Human-, Schwein-, Lama-, Kaninchen- und Pferde-Hämoglobin

Die Tatsache, daß der Austausch einer einzigen Aminosäure in einer der beiden Ketten von Humanhämoglobin bereits zur Hämoglobinopathie führen kann, zeigt die strenge Determinierung der Primärstrukturen von Hämoglobinen an. Unter diesem Gesichtspunkt ist es bemerkenswert, daß sich die Hämoglobine von Säugtieren durch eine größere Anzahl von Aminosäure-Austauschen unterscheiden. Es scheinen also für die Erfüllung der physiologischen Funktion des Hämoglobinmoleküls verschiedene Primärstrukturen möglich zu sein, die allerdings in ihrem spezies-spezifischen Aufbau streng determiniert sind.

Die Auszählung der Austausche gegenüber Human-Hämoglobin nach dem Prinzip des geringsten Austausches ergibt bei Pferd-, Schwein- und Lama-Hämoglobin folgende Minimalwerte:

Austausche in der:	α -Kette	β -Kette
Human/Pferd-Hämoglobin	17	24
Human/Schwein-Hämoglobin	17	23
Human/Lama-Hämoglobin	19	21

Dieser Vergleich zeigt, daß die Austauschrate in der β -Kette höher ist als in der α -Kette. Die größere Konstanz in der Austauschhäufigkeit bei der Phylogenese des Hämoglobinmoleküls läßt sich auch aus dem Vergleich der tryptischen Peptide der einzelnen Säuger-Hämoglobine erkennen. Die Analogie der tryptischen Peptide ist in der α -Kette nur bei einem Peptid durchbrochen: Das 29er Peptid αTp_9 ist bei den α -Ketten von Schwein-, Lama- und Kaninchen-Hämoglobin in ein 7er und ein 22er Peptid aufgespalten. Die Ursache dieser Aufspaltung liegt in einem Austausch des Asparaginsäure-Restes in Position 68 gegen einen Lysin-Rest, durch welchen eine neue Trypsin-sensitive Bindung vorliegt.

Mit dem Nachweis einer größeren Stabilität der α -Kette in der Phylogenese des Hämoglobinmoleküls läßt sich eine Hypothese von Ingram zur Evolution des Moleküls stützen. Ihrzufolge sollen sich von einer Ur- α -Kette ausgehend durch Gen-Duplikation und anschließende Translokation die β -, γ - und δ -Ketten entwickelt haben. Eine höhere Mutations-Stabilität des Genlocus der Ur- α -Kette läßt sich noch heute in der geringeren Austauschrate der α -Ketten der untersuchten Säuger-Hämoglobine erkennen.

Wesentlich größere Unterschiede in der Primärstruktur treten in den β -Ketten auf. So ergibt die tryptische Spaltung der β -Kette des Schwein-Hämoglobins 17 Spaltprodukte gegenüber nur 14 bei Human-Hämoglobin. Bei der β -Kette des Lama-Hämoglobins werden 16 tryptische Peptide gefunden. Zwei der bei Lama und Schwein auftretenden tryptischen Peptide sind analog: in Position 387 ist bei beiden Hämoglobinen der Threonin-Rest gegen einen Lysin-Rest und der Histidin-Rest in Position 3116 gegen einen Arginin-Rest ausgetauscht. Zusätzlich findet sich beim Schwein-Hämoglobin in Position 376 ein Alanin/Lysin-Austausch, welcher zu einem weiteren tryptischen Peptid führt. Der Cystein-Rest in Position 3112 ist beim Lama-Hämoglobin und beim Schwein-Hämoglobin jeweils gegen einen Valin-Rest ausgetauscht, so daß nur beim Human-Hämoglobin zwei Cystein-Reste in der β -Kette zu finden sind. Isoleucine treten nur bei Tierhämoglobinen auf, nicht aber im Hämoglobin des Menschen.

Die Annahme Pauling's, es bestehe eine bestimmte Relation zwischen Austauschrate und entwicklungsgeschichtlichem Alter, läßt einige vorsichtige phylogenetische Schätzungen zu. So ist die Zahl gemeinsamer Austausche in der α -Kette von Schwein- und Pferd-Hämoglobin gegenüber Human-Hämoglobin minimal acht. Identische Austausche bei Pferd- und Mensch-Hämoglobin gegenüber Schwein-Hämoglobin finden sich sieben, identische bei Schwein- und Mensch- gegenüber Pferd-Hämoglobin acht. Diese wesentlich konstante Zahl gleicher und gemeinsamer Austausche in den drei α -Ketten von Mensch-, Schwein- und Pferd-Hämoglobin spricht dafür, daß annähernd der gleiche phylogenetische Abstand zwischen diesen drei Spezies besteht.

II. Vergleichende Betrachtung von verschiedenen Tierhämoglobin-Primärstrukturen unter Einbeziehung der Tertiärstruktur

Nach Perutz (18) wird für das Hämoglobin der Säuger einschließlich das des Menschen eine im wesentlichen identische Tertiär- und Quaternärstruktur angenommen. Aus dem Vergleich der Unterschiede einzelner Primärstrukturen verschiedener Tiere können demnach Aufschlüsse über die Bedeutung unterschiedlicher Sequenzen für eine identische Tertiärstruktur erhalten werden. Als erste Frage läßt sich die nach der Sequenz-Konstanz in helikalen und interhelikalen Bereichen verschiedener Tier-Hämoglobine stellen. Die Zählung der Austausche in helikalen und nicht helikalen Abschnitten beider Ketten ergibt bei Lama-, Pferd- und Schwein-Hämoglobin folgende Werte:

		Austausch in:	
		helikalen Bereichen	interhelikalen Bereichen
α -Kette	Schwein-Hb	9	8
	Pferd-Hb	13	4
	Lama-Hb	15	4
β -Kette	Schwein-Hb	18	5
	Lama-Hb	20	1

Aus dieser Gegenüberstellung geht hervor, daß die Austauschrate bei den Hämoglobinen von Schwein, Lama und Pferd gegenüber Human-Hämoglobin in den helikalen Bereichen höher ist als in interhelikalen Abschnitten der Ketten. Ebenfalls wird aus dem Vergleich der helikalen und interhelikalen Austauschraten in der α -Kette und der β -Kette ersichtlich, daß sich die höhere Zahl der Austausche in den β -Ketten durch die Zunahme der Austausche in den helikalen Bereichen errechnet. Die größere Konstanz der interhelikalen Abschnitte in der Phylogenese des Moleküls deutet darauf hin, daß das wichtigere, formbildende Prinzip des Moleküls hauptsächlich in jenen Sequenzen liegt, welche die Übergänge und Verknüpfungen zwischen zwei helikalen Abschnitten darstellen. Die Bedeutung dieser nicht helikalen, sog. Ecken-bildenden Sequenzen liegt wohl in der Ausprägung von bestimmten Winkeln und Biegungen zwischen den im we-

sentlichen starren Helix-Strängen. Durch die nicht helikalen Übergänge werden die für das Hämoglobinmolekül erforderlichen Stellungen und Beziehungen der Helices zueinander ermöglicht, welche die charakteristische räumliche Struktur des Moleküls aufbauen.

Eine Zusammenstellung der Austausche in den einzelnen helikalen Bereichen verschiedener Säuger zeigt deutlich eine gewisse Häufung der Austausche in bestimmten helikalen Regionen. Andererseits werden einige Helices von Austauschen überhaupt nicht betroffen.

Austausche gegenüber Human-Hämoglobin

<i>Helix</i>	<i>in α-Kette des Hb von:</i>			<i>in β-Kette des Hb von:</i>	
	<i>Schwein</i>	<i>Lama</i>	<i>Pferd</i>	<i>Schwein</i>	<i>Lama</i>
<i>A</i>	2	7	2	4	8
<i>B</i>	2	2	2	0	0
<i>C</i>	0	0	0	0	1
<i>D</i>	1	0	0	0	0
<i>E</i>	2	5	5	4	4
<i>F</i>	0	1	1	1	2
<i>G</i>	2	0	2	5	2
<i>H</i>	—	—	1	4	3
<i>Summe :</i>	9	15	13	18	20

Die aus der Tabelle ersichtliche Aufteilung der helikalen Bereiche in Austausch-reiche und Austausch-arme Helix-Stränge läßt auf Unterschiede in der Konfigurationswertigkeit derselben schließen. So findet sich in der Austausch-armen F-Helix der wichtige Aminosäuren-Rest, der die Hämgruppe an das Globin fixiert; es ist dies das Histidin in Position $\alpha 87$ der α -Kette.

Vergleicht man die einzelnen Positionen, die von Aminosäurenaustauschen bei den verschiedenen Spezies betroffen sind, so wird die Bevorzugung bestimmter Positionen durch Austausche ersichtlich. Außer einer Häufung von Austauschen in bestimmten

Sequenzbereichen ist also auch eine Auswahl bestimmter Positionen für den Austausch zu erkennen. Zwei Beispiele können dies zeigen: das eine sei der Sequenz $\alpha 64$ - $\alpha 80$ der α -Kette, einem Teil des 29er Peptides beim Human-Hämoglobin entnommen, das andere Beispiel stammt aus der β -Kette, es ist das N-terminale Ende Pos. $\beta 1$ - $\beta 16$, in dem sich bis zu 6 Austausche finden:

Tabelle 9: Sequenzbereich von Pos. 62 bis Pos. 80 der α -Ketten

Hb von:	62	65	68	71	73	76	78												
Human	Val	Ala	Asp	Ala	Leu	Thr	Asp	Ala	Val	Ala	His	Val	Asp	Asp	Met	Pro	Asp	Ala	Leu
Pferd	Val	Ala	Asp	<u>Gly</u>	Leu	Thr	<u>Leu</u>	Ala	Val	<u>Gly</u>	His	<u>Leu</u>	Asp	Asp	<u>Leu</u>	Pro	<u>Gly</u>	Ala	Leu
Schwein	Val	Ala	Asp	Ala	Leu	Thr	<u>Lys</u>	Ala	Val	<u>Gly</u>	His	<u>Leu</u>	Asp	Asp	<u>Leu</u>	Pro	<u>Gly</u>	Ala	Leu
Lama	Val	Ala	Asp	<u>Gly</u>	Leu	Thr	<u>Lys</u>	Ala	Thr	Ala	His	<u>Leu</u>	Asp	Asp	<u>Leu</u>	Pro	Asp	Ala	Leu
Kaninchen	Val	Ala	<u>Glu</u>	<u>Ser</u>	Leu	Thr	<u>Lys</u>	Ala	Val	<u>Gly</u>	His	<u>Leu</u>	Asp	Asp	<u>Leu</u>	Pro	<u>Gly</u>	Ala	Leu
Karpfen	Val	Ala	Asp	<u>Gly</u>	<u>Ileu</u>	<u>Ser</u>	<u>Val</u>	Ala	Val	<u>Gly</u>	Lys	<u>Ileu</u>	Asp	Asp	<u>Leu</u>	Ser	<u>Gly</u>	Ala	Leu

E-Helix

EF

F-H

Tabelle 10: Sequenzbereich von Pos. 1 bis Pos. 18 der β -Ketten

Hb von:	1	4	5		9	12	13		17									
Human	Val	His	Leu	Thr	Pro	Glu	Glu	Lys	Ser	Ala	Val	Thr	Ala	Leu	Try	Gly	Lys	Val
Pferd	Val	Glu	Leu	Ser	Gly	Glu	Glu	Lys	Leu	Ala	Val	Asp	Ala	Leu	Try	Ala	Lys	Val
Schwein	Val	His	Leu	Ser	Ala	Glu	Glu	Lys	Leu	Ala	Val	Glu	Gly	Leu	Try	Gly	Lys	Val
Lama	Val	Asp	Leu	Ser	Gly	Asp	Glu	Lys	Gly	Ala	Val	Asp	His	Leu	Try	Ser	Lys	Val
Kaninchen	Val	His	Leu	Ser	Ser	Glu	Glu	Lys	Ser	Ala	Val	Thr	Ala	Leu	Try	Gly	Lys	Val
Esel	Val	His	Leu	Thr	Gly	Glu	Glu	Lys	Thr	Ala	Val	Asp	Thr	Leu	Try	Gly	Lys	Val

A-Helix

Die Einteilung der Peptidketten in Austausch-häufige und Sequenz-konstante Bereiche und Positionen durch den Vergleich verschiedener Hämoglobine läßt eine Gesetzmäßigkeit im Aufbau der räumlichen Struktur vermuten, welche aber erst nach Erlangung weiteren Vergleichsmaterials zu erkennen sein wird. Ebenso wird es erst dann möglich sein, definierte Aussagen

über phylogenetische Verwandtschaft und Abstammung einzelner Tiere auf Grund der Ähnlichkeit der Hämoglobinstruktur zu machen.

Die letzte Frage gilt den Sequenzen, welche die sog. Ecken in den helix-freien Bereichen ermöglichen. An den Übergängen von helikalen zu nicht helikalen Bereichen sind bei den Hämoglobinen von Mensch, Lama und Schwein in beiden Ketten folgende Aminosäuren gehäuft zu finden:

Prolin	15 mal
Histidin	9 mal
Asparaginsäure	14 mal

Die "Ecken-bildende" Fähigkeit von Prolin ist schon lange bekannt. Nach einer mündlichen Mitteilung von Perutz kommt eine solche auch der Asparaginsäure zu. Diese Aussage wird durch einen zweimaligen Pro/Asp-Austausch in Position $\beta 58$ und $\beta 125$ beim Schwein-Hämoglobin und einen Pro/Asp-Austausch in Position $\beta 125$ beim Lama-Hämoglobin gestützt.

Es ist weiterhin anzunehmen, daß am Helix-Ende Arginin von Histidin vertreten werden kann. Am Ende der G-Helix der β -Kette des Schwein- und des Lama-Hämoglobins sind nämlich folgende Austausche zu finden:

Tabelle 11: Sequenzbereich von Pos. 115 bis Pos. 119 der β -Ketten von:

	115				119
Human-Hb	Ala	His	His	Phe	Gly
Schwein-Hb	Ala	<u>Arg</u>	<u>Arg</u>	<u>His</u>	Gly
Lama-Hb	Ala	<u>Arg</u>	His	Phe	Gly

—————→
G-Helix

Die Betrachtung der Sequenzen an helikalen Übergängen macht es wahrscheinlich, daß an solchen Positionen die Rolle der "Ecken-Bildung" von einer Anzahl bestimmter Aminosäuren übernommen werden kann. Solche sind neben Prolin mit großer Wahrscheinlichkeit auch Asparaginsäure, Histidin und Arginin.

Diese Möglichkeit der wechselseitigen Stellvertretung bestimmter Reste an helikalen Übergängen stimmt mit der Häufung von Austauschen in diesen Sequenzbereichen überein. Die Zählung der Austausche in den Positionen, welche die helikalen Übergänge kennzeichnen oder in unmittelbarer Nachbarschaft gelegen sind, ergibt bei den Hämoglobinen von Pferd, Schwein und Lama die folgenden Werte:

Austausche an helikalen Übergängen		
α -Kette	Pferd-Hämoglobin	6
	Schwein-Hämoglobin	7
	Lama-Hämoglobin	6
β -Kette	Schwein-Hämoglobin	9
	Lama-Hämoglobin	7

Bei all diesen Betrachtungen sollte man sich jedoch bewußt sein, daß exakte Aussagen über das Verhältnis Primärstruktur zu Tertiärstruktur und Quaternärstruktur nur nach dem Vorliegen der räumlichen Modelle der einzelnen Hämoglobine zu machen sind. Die in dieser Arbeit angestellten Betrachtungen basieren auf der weitgehenden Analogie des chemischen und sterischen Aufbaus der Säuger-Hämoglobine.

Literaturverzeichnis

- 1) L.Pauling, H.A.Itano, S.J.Singer and I.C.Wells. 1949, Science 110, 543.
- 2) J.C.Kendrew, H.C.Watson, B.E.Strandberg, R.E.Dickerson, D.C.Phillips and V.C.Shore. 1961, Nature 190, 666.
F.M.Perutz, A.F.Cullis, H.Muirhead and M.G.Rossmann; 1962, Proc. Roy. Soc. 265, 161.
- 3) F.M.Perutz, J.F.Trotter, E.R.Howells and D.W.Green. 1955, Acta. Cryst. 8, 241.
F.M.Perutz, H.Muirhead, Cold Spring Harbor, Symp. Quant. 1963, 28, 451.
- 4) G.Braunitzer, R.Gehring-Müller, N.Hilschmann, K.Hilse, G.Hobom, V.Rudloff, B.Wittmann-Liebold. 1961, Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem. 325, 283.
- 5) T.Svedberg, K.O.Pedersen in "The Ultrazentrifuge". 1940, Oxford Univ. Press, London and New-York.
- 6) G.R.Stark, D.G.Smyth. 1963, J. Biol. Chem. 238, 213.
- 7) siehe Zusammenfassung W.B.Gratzer and A.C.Allison. 1960, Biol. Rev. Cambridge Phil. Soc. 35.
- 8) R.J.Hill and L.C.Craig. 1959, J. Am. Chem. Soc. 81, 2272.
- 9) R.J.Hill, W.Konigsberg, G.Guidotti and L.C.Craig. 1962, J. B. C. 237, 1549.
- 10) Th.C.Merigan, W.J.Dreyer und A.Berger. 1962, B.B.A. 62, 122; M.Sela, F.H.White und C.B.Anfinsen, 1957, Science 125, 691.
- 11) C.H.W.Hirs, J. Biol. Chem. 1956, 219, 611.
- 12) B.Liebold und G.Braunitzer. 1961, Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem. 315, 271.
- 13) V.Rudloff und G.Braunitzer. 1961, Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem. 323, 129.
- 14) siehe Angabe 3).
- 15) R.J.Block, E.L.Durum und G.Zweig - Paperchromatography and Paperelectrophoresis, Acad. Press, New York 1958.
- 16) D.H.Spackman, W.H.Stein and S.Moore, 1958, Anal. Chem. 30, 1190.
- 17) J.Sjöquist, 1959, Ark. Kemi, 14, 291.
- 18) siehe Angabe 3).

Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wird über Ergebnisse von Untersuchungen an verschiedenen Säugetier-Hämoglobinen berichtet. Weiterhin können methodische Verbesserungen angegeben werden, die bei der Säulenchromatographie von tryptischen, peptischen und chymotryptischen Peptiden entwickelt wurden.

Elektrophoretische und säulenchromatographische Untersuchungen an Hämoglobin-Lösungen des Schweins, Esels, Maulesels und Zebras zeigen charakteristische Haupt- und NebenkompONENTEN. Im Blut des Schweins und des Esels liegt jeweils nur eine Hauptkomponente vor, die direkt der weiteren Untersuchung zugeführt werden konnte.

Die α - und β -Kette des Schwein-Hämoglobins konnte in der Gegenstromverteilung isoliert werden. Der lösliche Anteil des tryptischen Hydrolysates beider Ketten wurde über Dowex 1x2 aufgetrennt. Die Rechromatographie erfolgte wahlweise über Dowex 50x2, phosphorylierte Cellulose oder Papierchromatographie. Die isoelektrisch fällbaren tryptischen Peptide wurden mit einem anderen Enzym nachgespalten: der Anteil der α -Kette mit Chymotrypsin, der der β -Kette mit Pepsin. Die so erhaltenen Sekundärspaltprodukte wurden ebenfalls mit säulenchromatographischen und papierchromatographischen Methoden isoliert.

Das Vorliegen einer weitgehenden Analogie der tryptischen Peptide innerhalb der Säugetier-Hämoglobine und sequenzanalytischen Untersuchungen an bestimmten Peptiden ermöglichten die Aufstellung einer Partialformel der Hauptkomponente des Schwein-Hämoglobins.

Im Schlußteil der Arbeit werden vergleichende Betrachtungen der Primärstrukturen verschiedener Säugetier-Hämoglobine unter dem Gesichtspunkt der Phylogenie des Hämoglobinmoleküls angestellt. Weiterhin werden die bis jetzt vorliegenden Primärstrukturen von Säugetier-Hämoglobinen im Hinblick auf das Verhältnis Primär-Tertiär-Quaternär-Struktur diskutiert.

Lebenslauf

Als Sohn des Studienrates Karl Köhler und seiner Ehefrau Arpadina Köhler, geb. Grohmann, wurde ich am 11. September 1939 in Duisburg geboren. Von 1945 bis 1959 besuchte ich die Volksschule in Gauting bei München. Im Herbst 1949 trat ich in das Humanistische Gymnasium München-Pasing ein und erhielt dort 1958 das Reifezeugnis.

Im Wintersemester 1958/59 immatrikulierte ich mich an der medizinischen Fakultät der Universität München. An dieser belegte ich die vor-klinischen Fächer und bestand am 25. Februar 1961 die ärztliche Vorprüfung. Das erste klinische Semester hörte ich anschließend an der medizinischen Fakultät in Wien. Darauf war ich wieder an der Universität München eingeschrieben. In dieser Zeit führte ich von Oktober 1961 bis Juli 1963 im Max-Planck-Institut für Biochemie, München, unter Leitung von Professor Dr. Adolf Butenandt meine Doktorarbeit durch. Im Juli 1964 bestand ich das medizinische Staatsexamen an der Universität München. Von Oktober 1964 bis Januar 1965 war ich als Medizinal-Assistent an der Chirurgischen Abteilung des Krankenhauses r.d. Isar in München und anschließend an der Inneren Fachklinik in Herrsching/Obb. bis Juli 1965 tätig.

